

EXPERIMENTE
UND UNTERSUCHUNGEN
ZUR TRENNUNG VON MENSCHLICHEN
X- BZW. Y-SPERMATOZOEN

Harald Schatz

Disbui. München

1988



Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c.mult. O. Braun-Falco

EXPERIMENTE UND UNTERSUCHUNGEN ZUR TRENNUNG
VON MENSCHLICHEN X- BZW. Y-SPERMATOZOEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
H a r a l d S c h a t z
aus München
München 1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.W.-B.Schill

Mitberichterstatter: 1. Prof.Dr.med.Dr.h.c.mult.O.Braun-Falco
2. Prof.Dr.R.Tauber

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.1988

INHALTSVERZEICHNIS

0.	ABKÜRZUNGEN	0
1.	EINLEITUNG	1
2.	GRUNDLAGEN	4
2.1.	Das menschliche Spermatozoon und seine Eigenschaften	4
2.1.1.	Das Ejakulat	4
2.1.1.1.	Zusammensetzung	4
2.1.1.2.	Die Ejakulatuntersuchung	5
2.1.2.	Morphologie des menschlichen Spermatozoon	7
2.1.3.	Unterschiede zwischen Gyno- und Androspermatozoen	9
2.1.4.	Nachweis des Y- Chromosoms bei mensch- lichen Spermatozoen	11
2.2.	Die Gradientenzentrifugation als Trennverfahren für Spermatozoen	14
2.2.1.	Prinzip der Dichtegradienten- zentrifugation	15
2.2.2.	Anwendung auf menschliche Spermatozoen	15
2.3.	Die Elektrophorese als Trennverfahren für Spermatozoen	16
2.3.1.	Prinzip der trägerfreien Ablenkungs- elektrophorese	16
2.3.2.	Anwendung auf menschliche Spermatozoen	17
2.4.	Methoden zur Selektion motiler Spermatozoen	18

3.	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1.	MATERIAL	19
3.1.1.	Herkunft der Ejakulate	19
3.1.2.	Reagenzien und Serata	19
3.1.3.	Technische Ausrüstung	19
3.2.	METHODEN	20
3.2.1.	Dichtegradientenzentrifugation von menschlichen Spermatozoen	20
3.2.1.1.	Gewinnung und Aufbereitung der Spermatozoen	21
3.2.1.2.	Herstellung der Gradienten	21
3.2.1.3.	Zentrifugation der Gradienten	23
3.2.1.3.1.	Vorversuche	23
3.2.1.3.2.	Kontrolle des Sedimentationsvorgangs beim Zentrifugieren	25
3.2.1.4.	Fraktionierung der Gradienten	26
3.2.1.5.	Analyse der Fraktionen	26
3.2.1.6.	Identifizierung der aufgetrennten Spermatozoen	26
3.2.1.7.	Trennversuche	28
3.2.2.	Die elektrophoretische Trennung von menschlichen X- und Y- Spermatozoen	30
3.2.2.1.	Schematische Darstellung der Arbeits- vorgänge	30
3.2.2.2.	Die Free- Flow- Elektrophorese-Apparatur	30
3.2.2.3.	Elphor VaP 21	31
3.2.2.3.1.	Gerätebeschreibung	32
3.2.2.3.2.	Gewinnung und Aufbereitung der Spermatozoen	32
3.2.2.3.3.	Vorbereitung der Trennkammer	33
3.2.2.3.4.	Herstellung und Wahl des Puffersystems	33
3.2.2.3.5.	Vorversuche	36
3.2.2.3.6.	Trennexperimente	38

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.3.7.	Analyse der Fraktionen	41
3.2.2.3.8.	Identifizierung der aufgetrennten Spermatozoen	42
3.2.2.3.9.	Versuch der Spermatozoentrennung durch die Free- Flow- Isotachophorese	43
3.2.2.4.	ACE 710	45
3.2.2.4.1.	Gerätebeschreibung	45
3.2.2.4.2.	Gewinnung und Aufbereitung der Spermatozoen	46
3.2.2.4.3.	Vorbereitung der Trennkammer	49
3.2.2.4.4.	Herstellung und Wahl des Puffersystems	50
3.2.2.4.5.	Trennexperimente	51
3.2.2.4.6.	Analyse der Fraktionen	53
3.2.2.4.7.	Identifizierung der aufgetrennten Spermatozoen	53
3.2.3.	Eine Migrations-Sedimentations-Technik für Spermatozoen und ihr Einfluß auf die Motilitäts- und Geschlechtsverteilung	54
3.2.3.1.	Gerätebeschreibung	54
3.2.3.2.	Prinzip	54
3.2.3.3.	Durchführung der Experimente	56
3.2.3.4.	Analyse der Spermatozoenproben	56
3.2.3.4.1.	Motilitätsmessungen mit dem Mikroprozessor-Bildanalyse-System AT-CAS 188	56
3.2.3.4.2.	X- Y- Identifizierung der Spermatozoen	57
4.	ERGEBNISSE	
4.1.	Dichtegradientenzentrifugation von menschlichen Spermatozoen	58
4.1.1.	Vorversuche	58
4.1.2.	Trennversuche	62

4.2.	Die elektrophoretische Trennung von menschlichen X- und Y- Spermatozoen	76
4.2.1.	Elphor VaP 21	76
4.2.1.1.	Vorversuche	76
4.2.1.2.	Trennexperimente	80
4.2.1.2.1.	Störfaktoren	80
4.2.1.2.2.	Der Einfluß einzelner Parameter auf die Trennung	80
4.2.1.2.3.	Resultate der analytischen Aufarbeitung	83
4.2.1.2.4.	Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse	85
4.2.1.3.	Ergebnisse der Free- Flow- Isotachophorese	88
4.2.2.	ACE 710 UV/VIS	89
4.2.2.1.	Ergebnisse der Trennexperimente	89
4.2.2.1.1.	Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis	89
4.2.2.1.2.	Restmotilität der getrennten Spermatozoen	100
4.3.	Die Migrations-Sedimentations-Technik	101
4.3.1.	Ergebnisse der Motilitätsmessungen	101
4.3.2.	X- Y- Verteilung der Spermatozoen	103
5.	DISKUSSION	104
5.1.	Dichtegradientenzentrifugation	104
5.1.1.	Die Spermatozoenverteilung im Gradienten	104
5.1.2.	Verfälschung der Auftrennung durch die Eigenbewegung der Spermatozoen	106
5.1.3.	X- Y- Verteilung der Spermatozoen im Gradienten	108
5.1.4.	Qualität der Trennung	109
5.1.4.1.	Nachweis der X- Y- Trennung	109
5.1.4.2.	Trenngüte	110
5.1.4.3.	Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse	110

5.1.5.	Die Dichtegradientenzentrifugation als Verfahren zur Anreicherung motiler Spermatozoen	111
5.2.	Free- Flow- Elektrophorese	113
5.2.1.	Das Verhalten der Spermatozoen im elektrischen Feld	113
5.2.2.	Unterschiedliche elektrophoretische Beweg- lichkeit von X- und Y- Spermatozoen	114
5.2.3.	Qualität der Trennung	116
5.2.4.	Reproduzierbarkeit der Trennung	116
5.2.5.	Die Motilität der Spermatozoen nach der Trennung	117
5.2.6.	Diskussion der Störmöglichkeiten	118
5.2.6.1.	Apparatur-bedingte (technische) Fehlermöglichkeiten	118
5.2.6.2.	Unterschiede im Spermatozoenmaterial	118
5.2.6.3.	Einflüsse durch Bestandteile im Seminalplasma	120
5.2.6.4.	Effekte durch Manipulationen am Probenmaterial	120
5.2.6.5.	Einflüsse durch das elektrische Feld	121
5.3.	Die Migrations-Sedimentations-Technik	123
5.3.1.	Eine Technik zur Anreicherunmg motiler Spermatozoen	123
5.3.2.	Verhalten von X- und Y- Spermatozoen in der M-S-Kammer	123
5.4.	Schlußfolgerungen	125
6.	ZUSAMMENFASSUNG	127
7.	LITERATURVERZEICHNIS	129
8.	DANKSAGUNG	139
9.	LEBENS LAUF	140

Abb.	Abbildung
d	Deviation (= Ablenkung)
E	elektrische Feldstärke
F-body	fluorescent body
HSA	Human-Serumalbumin
I	elektrische Stromstärke
M-S-	Migrations-Sedimentations-
T	Temperatur
t	Verweilzeit
Tab.	Tabelle
U	elektrische Spannung
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Detektion
V	Volumen
VIS	Detektion im sichtbaren Spektrum
w	Zentrifugationsgeschwindigkeit
#	Nummer
ϱ	Dichte
σ	Standardabweichung
$\bar{x}$	Mittelwert

Der Wunsch des Menschen, das Geschlecht seiner Nachkommen zu bestimmen, war seit altersher ein Nährboden für mystische Bräuche, Hexereien oder andere Bemühungen, der Natur in diesem Punkt ein wenig nachzuhelfen. Selbst Abtreibung und Kindesmord werden als Mittel zur Geschlechtsbeeinflussung bis zum heutigen Tag praktiziert und man fragt sich, ob es nicht elegantere Methoden gibt, den "Stammhalter" oder das "Wunschkind" auf die Welt zu bringen.

Forscher und Ärzte entwickelten durch Empirie die verschiedensten Methoden, um die Sexratio zu beeinflussen. Ihre Ratschläge zu Zeitpunkt und Technik des Koitus oder Anwendungen von Heilkräutern und vaginalen Spülungen blieben jedoch weitgehend erfolglos.

Erst als zu Anfang dieses Jahrhunderts, im Rahmen der Entdeckung des Chromosoms und der daraus resultierenden Vererbungsmechanismen, die Bedeutung des Spermatozoon als der geschlechtsbestimmende Faktor erkannt wurde, war die Voraussetzung für ein gezieltes Eingreifen in den Ablauf der Konzeption geschaffen.

Jetzt richtete sich das Augenmerk der Wissenschaftler besonders auf die unterschiedlichen Eigenschaften von Gyno- und Androspermatozoen, um die Samenzellen der einen oder anderen Art an der Befruchtung zu hindern oder sie zu begünstigen.

So beschrieb UNTERBERGER 1930 eine Methode zur Knabenkonzeption. Seine Scheidenspülungen mit Natriumbicarbonat führten angeblich in 53 zu 1 Fällen zum Erfolg.

Weniger zweifelhaft erscheinen eine große Reihe von Bemühungen, die Spermatozoen vor dem Eintritt in den weiblichen Genitaltrakt nach X- und Y- Chromosomenträgern zu separieren. Mit Methoden, wie der Chromatographie mit Ionenaustauschern (DOWNING et al. 1976) oder Dextrangelen (QUINLIVAN 1974, STEENO 1975) der Sedimentation in viskösen Medien (ERICSSON 1973, QUINLIVAN 1974) oder der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation (SHASTRY 1977, PORSTMAN 1978, KANEKO 1983, 1984) sollten vor allem die Unterschiede in Größe, Dichte und Schwimmverhalten der Spermatozoen die Grundlagen für eine X-Y-Trennung der Samenzellen bilden.



Ein anderer Ansatzpunkt ist das Verhalten der Spermatozoen in einem elektrischen Feld, wobei man von unterschiedlichen Oberflächenladungen auf den Samenzellen ausgeht (SHIRAI 1974, DANIELL 1982, KANEKO 1983, 1984).

Leider gibt es in der gesamten Literatur keine einheitliche Bewertung der Effektivität dieser Methoden. Es fällt dem Interessierten schwer, die wahren Möglichkeiten zur X- Y-Trennung von Samenzellen zu erkennen und objektiv zu beurteilen (GLEDHILL 1983, GARNER 1984, KRAUSE 1984).

Was wäre jedoch mit der Möglichkeit gewonnen, das Geschlecht der Nachkommen schon bei der Zeugung festzulegen?

Ungeachtet der ethisch-moralischen Frage, die eine willkürliche Beeinflussung des Geschlechts bei Mensch und Tier aufwirft, gibt es eine Reihe von medizinischen Indikationen, die zumindest aus ärztlicher Sicht ein Eingreifen in die Sexratio legitimieren würden.

Allen voran stehen die X-chromosomal vererbbaeren Krankheiten mit rezessiver Ausprägung, mit der Muskeldystrophie Duchenne, der klassischen Hämophilie A und der Rot-Grün-Blindheit als den häufigsten Vertretern.

Die Gesamthäufigkeit aller bisher bekannten X-chromosomal bedingten Leiden wird nach MURKEN und CLEVE (1984) auf 0,08 % der männlichen Lebendgeborenen geschätzt. Diese Zahl wird noch eindrucksvoller, wenn man den Anteil der Totgeburten und fötalen Abgänge mitberücksichtigt. Bis heute wurden über 100 X-chromosomale Erkrankungen beschrieben, von denen die Mehrzahl rezessiv vererbt werden, bei einem männlichen Genträger jedoch dominant zur Ausprägung kommen. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß beim X-Chromosom bisher mit Abstand die meisten Genloci aller Chromosomen registriert werden konnten.

Resultierend aus dem großen medizinischen und wissenschaftlichen Interesse, das der Spermatozoentrennung entgegengebracht wird, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Erforschung von Separationsmöglichkeiten für Gyno- und Androspermatozoen.

Von allen in der Literatur beschriebenen Trennverfahren erschienen die Dichtegradientenzentrifugation und die galvanische Trennung durch die moderne Free- Flow- Elektrophorese als die vielversprechensten Ansätze.

Die experimentelle Aufarbeitung dieser Methoden ist das Ziel der folgenden Versuche.

Ergänzend soll auch der Einfluß einer neu entwickelten Migrations-Sedimentations-Technik auf die Geschlechtsverteilung der Samenzellen untersucht werden.

2.1. Das menschliche Spermatozoon und seine Eigenschaften

2.1.1. Das Ejakulat

2.1.1.1. Zusammensetzung

Das menschliche Sperma besteht zum einen aus den Spermatozoen, zum anderen aus dem Trägermedium, dem sog. Seminalplasma. Bei der Ejakulation werden die einzelnen Sekretanteile innerhalb von Sekunden nacheinander entleert und vermischen sich erst in der Vagina. Durch fraktioniertes Auffangen dieser Anteile erhält man ein sog. Split-Ejakulat, das in folgende 3 Fraktionen differenziert werden kann (ELIASSON und LINDHOLMER 1972, KORTING 1981):

- Die Vorfraktion enthält hauptsächlich Sekrete aus den Cowperschen und den Littréischen Drüsen, sowie partiell der Prostata
- Die Hauptfraktion setzt sich zusammen aus Sekreten des Hodens, Nebenhodens, Ductus deferens und der Prostata und enthält außerdem den Hauptanteil der Spermatozoen (flockige Anteile).
- Die Nachfraktion enthält hauptsächlich das Sekret der Bläschendrüsen.

Zentrifugiert man ein Ejakulat schonend, so erhält man als Bodensatz die zellulären Bestandteile des Samens, der zellfreie Überstand ist flüssig und wird als Seminalplasma bezeichnet.

Das Sediment besteht im wesentlichen aus Spermatozoen, enthält aber auch andere Zellen in geringen Mengen.

Physiologischerweise findet man Zellen der Samenreifungsreihe, meistens Spermatiden. Die lichtmikroskopische Abgrenzung zu Lymphozyten und Granulozyten, die ebenfalls im Ejakulat vorkommen, ist oftmals schwierig. Weiter kommen Epithel- und Drüsenzellen aus verschiedenen Abschnitten des Genitaltraktes vor. Das Auftreten von Erythrozyten, Protozoen und

Bakterien ist als pathologisch anzusehen.

Das Seminalplasma enthält Elektrolyte, Kohlenhydrate, Aminosäuren und Proteine, vor allem Enzyme. Vergleicht man es in seiner Zusammensetzung mit Blutserum, so fällt auf, daß die Grundkomposition nahezu identisch ist, einzelne Bestandteile jedoch in ihrem quantitativen Vorkommen stark variieren. So sind Kalium, Fruktose (das neben Glukose als Energielieferant für die Spermatozoen dient), Alpha-1- und Gammaglobuline, Prostaglandine, sowie eine Reihe von Enzymen (saure Phosphatase der Prostata, Proteinaseinhibitoren (COLLE et al. 1976) etc.) im Seminalplasma erheblich höher konzentriert als im Blutserum. Deren Bedeutung ist zum Teil noch ungeklärt. An Hormonen finden sich neben Testosteron, Prolaktin, FSH und LH in geringeren Konzentrationen auch Steroide. Besondere Aufmerksamkeit erregten die Entdeckungen des Renin-Angiotensin-Systems, sowie des Kallikrein-Kinin-Systems innerhalb des Seminalplasmas.

2.1.1.2. Die Ejakulatuntersuchung

Klinische und wissenschaftliche Fragestellungen können eine Ejakulatuntersuchung notwendig machen. Folgende Liste stellt die morphologischen und biochemischen Parameter zusammen, nach denen die Qualität eines Ejakulats beurteilt wird. Die nebenstehenden Angaben sind Normwerte (SCHILL et al. 1985):

Volumen	2,0 - 8,0 ml
pH	7,0 - 7,8
Geruch	kastanienblütenartig
Farbe	grau - weiß - gelblich
Konsistenz	zähflüssig - flockig
Spermatozoenzahl*	20 Mio./ml
Spermatozoenmotilität**	50% , davon
sehr lebhaft (progressiv)	30%
mäßig (ortsbeweglich)	20%
unbeweglich	50%
mormale Morphologie	50%

- * Die Auszählung der Spermatozoen erfolgt in einer Thoma-Zeiss- bzw. Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) nach 20 facher Verdünnung mit aqua dest. und anschließender Umrechnung in Spermatozoen/ml.
- ** Vielfältige Methoden zur Bestimmung der Spermatozoenmotilität wurden entwickelt (JECHT et RUSSO 1973, JOUANNET et al. 1976, MAKLER 1978).
In dieser Arbeit wurde die Schätzung durch routiniertes Laborpersonal (SCHIRREN 1982) und in besonderen Fällen die Computer Aided Picture Analysis (BRUNNER 1986) angewendet.

Ein weiteres Kriterium für die Vitalität der Samenzellen ist der Eosintest. Tote Spermatozoen weisen eine defekte Zellmembran auf und färben sich im Nativpräparat durch Eosin rot an, während intakte, lebende Zellen ungefärbt bleiben.

Auch biochemische Untersuchungen des Seminalplasmas können diagnostisch wertvoll sein. Besondere Bedeutung haben dabei die Bestimmung von Fruktose, Carnitin, Trypsininhibitor, Zink, saure Phosphatase und Sexualhormone (SCHILL 1985).

Eine Eigenschaft von besonderer Bedeutung für die nachstehenden Experimente ist die Tendenz mancher Ejakulate zur Autoagglutination der Spermatozoen (FRIBERG 1974). Dieses Phänomen beruht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen gegenüber Oberflächenproteinen der Spermatozoen und kann in Form von Kopf-Kopf-, Schwanz-Schwanz- und gemischten Agglutinationen beobachtet werden. Solche Effekte können sich durch physikalische und chemische Einwirkungen verstärken und können damit die Auftrennung von Spermatozoen erheblich erschweren.

2.1.2. Morphologie des menschlichen Spermatozoon

Das ausgereifte Spermatozoon ist eine hochdifferenzierte Zelle, speziell ausgerüstet für den Transport des väterlichen Genmaterials zur mütterlichen Eizelle, jedoch fehlen ihr die Fähigkeiten zu Wachstum oder Zellteilung. Die morphologischen Schwankungen von Human-Spermatozoen sowohl innerartlich, als auch im Rahmen eines Individuums, sind erstaunlich groß, ganz im Gegensatz zur Homogenität der meisten anderen Säugetier-Spermatozoen.

Den schematischen Aufbau einer menschlichen Samenzelle veranschaulicht Abb.1 (LUDVIK 1976, HOLSTEIN 1981).

Das Spermatozoon hat ausgestreckt eine Länge von ca. 60 μm und setzt sich zusammen aus

- 1) dem Kopf, mit einer Länge von 3-5 μm , der den Kern (N) mit dem haploiden Chromosomensatz enthält. Der Nucleus ist umgeben von einer Kernmembran (KM) und weist am distalen Anteil Kernporen (KP) auf. Der größte Teil des Kopfes ist von der Akrosomenkappe (A) umgeben, die wichtige biochemische Transmitter für den Penetrationsvorgang enthält. Alles ist umschlossen vom Plasmalemm (P), der dünnen Außenmembran des Spermatozoon.
- 2) dem 1 μm langen Hals, der über die Basalplatte (BP) als gelenkiges Verbindungsstück zum Mittelteil fungiert (Z = Zentromer) und die Zentriolen enthält.
- 3) dem Mittelstück, mit einer Länge von 5-7 μm , das um den zentralen Achsenfaden schraubenartig angeordnete Mitochondrien (M) aufweist. Hier wird die Hauptenergiemenge für den Fortbewegungsapparat synthetisiert.
- 4) dem etwa 50 μm langen Schwanz, dessen Kernstück, der Achsenfaden (AF), aus Fibrillen besteht, die in einer charakteristischen "9+2" Bauweise angeordnet sind (2 Zentralfibrillen sind von 9 Doppelfilamenten umgeben).

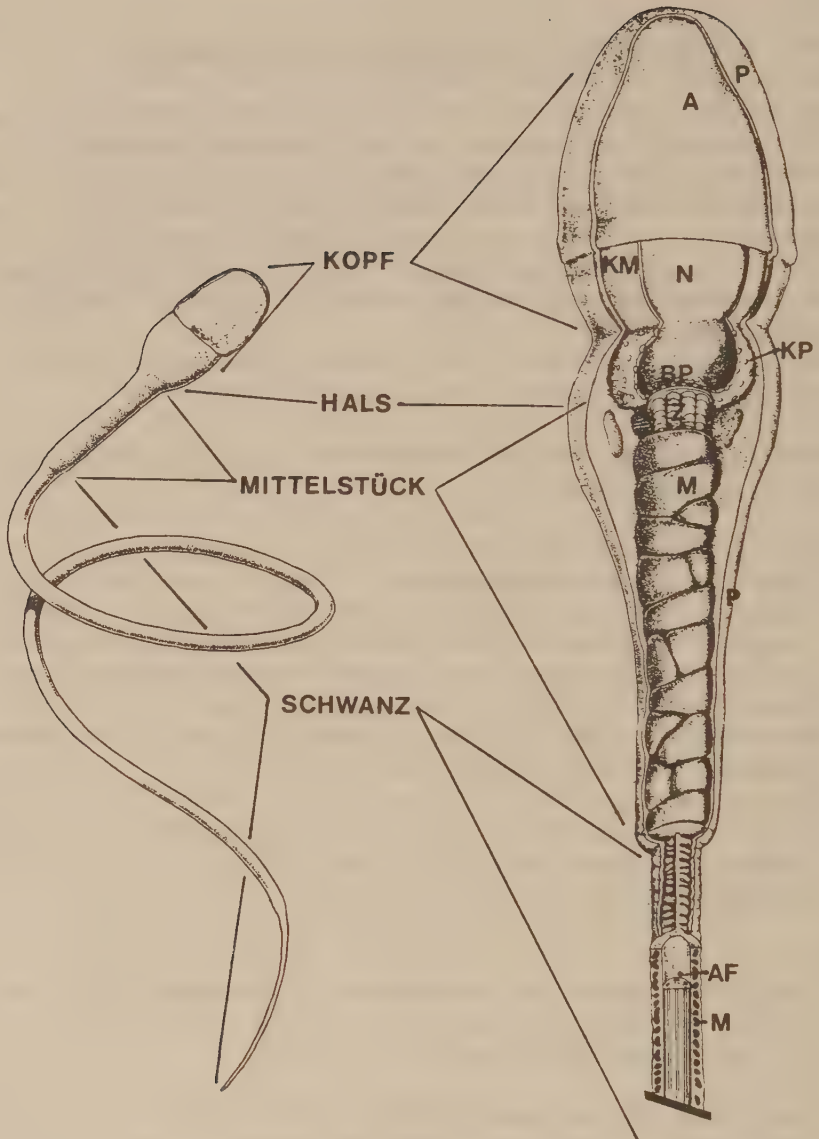


Abb.1: Das menschliche Spermatozoon
(modifiziert nach HOLSTEIN 1981)

2.1.3. Unterschiede zwischen Gyno- und Androspermatozoen

Größe:

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von luftgetrockneten, ungefärbten Ausstrichen menschlicher Spermatozoen entdeckte SHETTLES (1960) Unterschiede in der Morphologie der Samenzellen, die auf zwei verschiedene Populationen hindeuten. Die getrockneten Spermatozoen unterteilen sich demnach in größere Zellen mit ovalen Köpfen und etwas kleinere Samenzellen mit runden Köpfen. Diese zwei Kategorien lassen sich bei allen Ejakulaten finden und die morphologischen Merkmale sind innerhalb eines Individuums sehr konstant. Vergleicht man jedoch die Spermatozoen unterschiedlicher Spender miteinander, so findet man unter Umständen große Unterschiede in Größe und Form der Gameten.

Klarere Ergebnisse erbrachten die morphometrischen Untersuchungen von PORSTMANN et al. (1978), der Kopf- und Kernflächen von menschlichen X- und Y- Spermatozoen miteinander verglich und dabei feststellte, daß die Kopfgröße bei mit Quinacrin gefärbten Spermatozoen annähernd gleich war, die Kernflächen beider Typen sich jedoch im Mittel um 7,2 % zugunsten der X- Spermatozoen unterschieden.

DNA-Gehalt:

Dieser Größendimorphismus und die Tatsache, daß auch die Geschlechtschromosomen eine unterschiedliche Größe aufweisen hat Wissenschaftler dazu veranlaßt, den DNA-Gehalt von Gyno- und Androspermatozoen zu bestimmen. JANSEN und LEEFLANG unternahmen 1966 Feulgen-Photometrische Messungen an Bullenspermatozoen und beschrieben einen höheren DNA-Gehalt bei X-Spermatozoen im Gegensatz zu den Y- Spermatozoen. STOLLA fand 1969 bei Untersuchungen an Eberspermatozoen mit Hilfe eines UV-Mikrospektrophotometers ebenfalls Anhaltspunkte für die Existenz zweier Populationen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt. 1971 berechneten SUMNER und ROBINSON nach mikrodenso-metrischen Messungen an fluoreszenzmarkierten Spermatozoenausstrichen beim Menschen einen DNA-Unterschied von 2,7 +/- 0,86% zugunsten der X-Spermatozoen.

Dichte:

Da die Dichte einer Zelle sehr stark von der Osmolarität ihrer Umgebung abhängt, lassen sich keine absoluten Angaben über den Dichteunterschied von X- und Y-Spermatozoen machen, jedoch wurden bei einer Reihe von Experimenten mit Dichtegradienten ein unterschiedliches Sedimentationsverhalten (X schwerer, als Y) beobachtet (PORSTMANN 1978, KANEKO 1984).

Schwimmverhalten - Motilitätsunterschiede:

Daß Y-Spermatozoen sich schneller fortbewegen als X-Spermatozoen gilt heute als gesichert (ERICSSON et al. 1973). So konnten durch geeignete Experimente feine Unterschiede im Schwimmverhalten gefunden werden. Durch Sedimentationsversuche fand z.B. ROBERTS 1972 heraus, daß X-Spermatozoen durchschnittlich schneller sedimentieren und sich leichter in Richtung der Erdanziehung ausrichten (positive Geotaxis), während Y-Spermatozoen eher dazu tendieren, entgegen der Schwerkraft in den Überstand zu schwimmen.

SARKAR (1984) setzte Spermatozoen einem laminaren Flow aus (in einem Apparat, der ursprünglich zur Eliminierung toter Spermatozoen konzipiert war) und entnahm an verschiedenen Stellen Proben. Aus der unterschiedlichen Anreicherung von X- und Y-Zellen postulierte er ein differenziertes Schwimmverhalten von Gyno- und Androspermatozoen.

Immunologische Unterschiede:

Seit der Entdeckung des Y-linked histocompatibility-Antigens durch EICHWALD und SILMSER (1955), wurde mit Hilfe immunologischer Methoden versucht, X-Y-Trennungen durchzuführen, jedoch bisher ohne Erfolg (BROER et al. 1977).

Verhalten im elektrischen Feld:

1961 unternahm BANGHAM galvanische Experimente an Spermatozoen und beobachtete zwei Populationen, die er als tail-anode sperm und head-anode sperm bezeichnete und ihnen eine unterschiedliche Nettoladung zuschrieb. Eine ganze Reihe von elektrophoretischen Trennversuchen (siehe S.17) führen zu der Annahme, daß Gyno- und Androspermatozoen unterschiedlich starke Oberflächenladungen aufweisen.

2.1.4. Nachweis des Y- Chromosoms bei menschlichen Spermatozoen

Bereits bei früheren Färbeversuchen an Metaphasechromosomen aus menschlichen Lymphozyten fiel auf, daß das Y- Chromosom gegenüber allen anderen Chromosomen eine höhere Affinität zu Kernfarbstoffen (wie z.B. Giemsa, Leishman-Farblösung) oder DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen aufweist (SCHATZ 1979). Daß dies auch im Kern von menschlichen Spermatozoen der Fall ist, der sich zwar nicht im Stadium der Metaphase befindet, im Gegensatz zur Interphase jedoch ca. 10 fach kondensierte Chromosomen enthält (PEARSON et al. 1970, WAGNER und YUN 1981), zeigen die Färbeversuche von BARLOW und VOSA (1970) mit dem Fluoreszenz-Kernfarbstoff Quinacrin (Atebrin). Sie beschreiben einen weißlich fluoreszierenden Punkt mit einem Durchmesser von 0,25 - 0,3 μm , der meist im vorderen Teil des Spermatozoenkopfes lokalisiert ist und als F-body bezeichnet wird. Abb.2 zeigt das fluoreszenz-mikroskopische Bild eines Spermatozoon mit F-body.



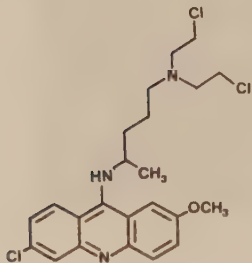
Abb.2: F-body

Daß es sich dabei wirklich um das Y- Chromosom oder einem Teil davon handelt. beweisen Untersuchungen an XYY- Männern, die 2 F-bodys in ihren Samenzellen erkennen lassen. Dieses Phänomen kann nur bedeuten, daß selbst im Kern des Spermato-

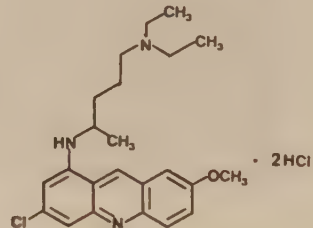
zoon die DNA des Y- Chromosoms enger gefaltet ist oder sich aus anderen Gründen mit dem Farbstoff leichter verbindet. BARLOW et al. (1970) glauben, daß es sich bei dem dichteren Areal um das distale Segment des langen Armes des Y- Chromosoms handelt. OLESKE et al. (1971) bestätigten diese Ergebnisse, stellten aber fest, daß auch andere Chromosomenstrukturen (Autosom #3, Chromosomen der D-Gruppe) in der Lage sind, F-body's vorzutäuschen.

Da Versuche mit anderen DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (wie Acridinorange oder Ethidiumbromid) keine ähnlichen Ergebnisse brachten, muß es sich um einen spezifischen Bindungsmechanismus des Atebrins handeln. CASPERSSON et al. (1970) nehmen zwei mögliche Reaktionsmechanismen zwischen Quinacrin und der DNA an:

- erstens eine Alkylierungsreaktion zwischen aktivierten -CH₂- Gruppen des Farbstoffes mit dem Guanin der DNA (dies trifft besonders für das Quinacrine Mustard zu),
- zweitens durch Bildung eines Interkalationskomplexes des Farbstoffmoleküls in der Doppelhelix der DNA.



Quinacrine Mustard



Quinacrin-Dihydrochlorid

Abb.3: Struktur von Quinacrine Mustard
und Quinacrin-Dihydrochlorid

Von allen Quinacrin-Derivaten sind Quinacrine Mustard und Quinacrin-Dihydrochlorid am gebräuchlichsten. Quinacrine Mustard hat dabei den Vorteil, daß die Färbung unter UV-Beleuchtung wesentlich länger standhält, während sie bei Verwendung von Quinacrin-Dihydrochlorid bereits nach wenigen Minuten ausbleicht (BARLOW und VOSA 1970). Doch auch bei Färbung mit Quinacrine Mustard wird nicht jedes Y-Chromatin dargestellt. Untersucht man normale Ejakulate auf ihren Anteil an F-body-tragenden Spermatozoen, so erhält man nur in den seltensten Fällen einen Anteil von 50% F-body, die durchschnittliche Rate liegt bei 45% F-body (BROER und KAISER 1975).

Das bedeutet, daß nicht alle Y-Chromosomen markiert werden oder unzureichend von ihrer Umgebung abzugrenzen sind. ROBERTS und GOODALL (1976) kamen aufgrund mathematisch-physikalischer Berechnungen zu dem Schluß, daß nur solche F-body mit Sicherheit zu erkennen sind, die sich in Nähe der Oberfläche der Spermatozoenkopfes befinden. Im Zentrum gelegene F-body können demnach durch anderes Kernmaterial überdeckt werden.

Trotz dieser Einschränkungen gilt die Färbemethode mit Quinacrinderivaten als gut reproduzierbar. Sie wurde in den letzten 15 Jahren mehrmals modifiziert und stellt immer noch die einfachste Methode zur Bestimmung des Sex-Chromosoms bei Spermatozoen dar.

In dieser Arbeit diente sie zur Überprüfung der Effektivität der beschriebenen Spermatozoen-Trennverfahren.

2.2. Die Gradientenzentrifugation als Trennverfahren für Spermatozoen

2.2.1. Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation wird seit vielen Jahren erfolgreich zur Trennung und Reinigung von Zellen, Bakterien, Viren und subzellulären Partikeln eingesetzt (PEETERS 1976). Schon geringe Differenzen in Dichte oder Größe der zu trennenden Substanzen können bei geeigneter Wahl des Gradientenmediums zur isopyknischen Trennung ausgenützt werden. Das Gradientenmedium muß dazu folgende Forderungen erfüllen:

- Das Spektrum der Dichteabstufungen soll den zu untersuchenden Partikeln angepaßt sein.

Der Gradient soll

- isoton,
- iso-osmolar,
- pH-angepaßt,
- nicht toxisch,
- für biologische Membranen unpassierbar,
- steril,
- kaum viskös,
- leicht aus der getrennten Substanz entfernbar sein
- und möglichst nicht mit analytischen Testverfahren interagieren.

Häufig gebrauchte Gradientenmedien sind Zuckerlösungen (z.B. Saccharose), Eiweißlösungen (Albumingradienten) oder Kieselgelderivate (wie z.B. Percoll^R).

Entscheidend für den Erfolg einer isopyknischen Trennung ist die richtige Komposition des Gradienten. Das Dichtegefälle muß dem jeweiligen Trenngut angepaßt sein, ebenso die Zentrifugationsdauer und -Geschwindigkeit.

Die Herstellung des Gradienten erfolgt entweder durch exaktes Überschichten von Medien absteigender Dichte (diskontinuierlicher Gradient) oder stufenlos durch scharfes Zentrifugieren oder mittels spezieller Apparaturen (kontinuierlicher Gradient).

Für den eigentlichen Separationsvorgang wird das Trenngut auf den fertigen Gradienten aufgeschichtet und bei geeigneten Bedingungen zentrifugiert. Die zu trennenden Partikel sedimentieren nun solange gegen den Gradienten, bis die eigene Dichte der des umgebenden Mediums entspricht (= isopyknisch).

2.2.2. Anwendung auf menschliche Spermatozoen

In der Literatur finden sich viele, unterschiedlich erfolgreiche Bemühungen, die morphologischen Unterschiede von X- und Y- Spermatozoen (siehe S. 9) zur isopyknischen Trennung auszunützen (PORSTMANN et al. 1978, KANEKO et al. 1984, 1983). Neben Saccharose und Dextran zeigte vor allem Percoll^R als Gradientenmedium die besten Ergebnisse. So trennten ARCIDIACONO et al. (1983) menschliche Spermatozoen mit geringsten Dichteunterschieden unter Verwendung von Percoll-Gradienten und bezeichneten sie als Spermatozoen-Subpopulationen.

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit den Möglichkeiten der Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll^R bei menschlichen Spermatozoen und der Optimierung dieses Verfahrens.

2.3. Die Elektrophorese als Trennverfahren für Spermatozoen

2.3.1. Prinzip der trägerfreien Ablenkungs-Elektrophorese (HANNIG 1975)

Im Gegensatz zu anderen Elektrophoreseverfahren, die auf statische Ladungsträger, wie z.B. Gele angewiesen sind, befindet sich bei der trägerfreien Ablenkungs-Elektrophorese (= Free-Flow-Elektrophorese) das zu trennende Substanzgemisch in einem kontinuierlich fließenden Pufferstrom, der sich im rechten Winkel zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes bewegt. Alle elektrisch geladenen Stoffe, auch größere Biosysteme, wie Zellen, Bakterien etc. werden dabei senkrecht zur Strömungsrichtung abgelenkt. Der Winkel, der sich dabei zur Strömungsrichtung ausbildet, resultiert aus der Strömungsgeschwindigkeit (v) des Puffers und der elektrophoretischen Beweglichkeit (U) des Teilchens. U ist ein Ausdruck der Summe der Oberflächenladungen des Teilchens und ergibt sich aus der senkrechten Ablenkung = Deviation (d), der Verweildauer im elektrischen Feld (t) und der Feldstärke (E) nach folgender Formel:

$$U = \frac{d}{t \cdot E} \quad (\text{um sec}^{-1} \text{ V}^{-1} \text{ cm});$$

Für die reproduzierbare Auftrennung eines Substanzgemisches mit Hilfe dieser Methode ist es eine Voraussetzung, daß die elektrophoretische Beweglichkeit eine spezifische Größe für ein geladenes Teilchen darstellt. Die bisherigen Erfahrungen mit dieser Methode zeigen, daß dies bei den meisten Substanzen der Fall ist.

Weil bei Trennversuchen mit Zellen und anderen größeren Partikeln die Gravitationskräfte den Trennverlauf stören können, ist es angebracht die Kammer vertikal anzuordnen und so die Sedimentation der Partikel in Richtung der Pufferströmung zu verlegen.

2.3.2. Anwendung auf menschliche Spermatozoen

Unter physiologischen Bedingungen ist die Nettoladung eines menschlichen Spermatozoons negativ. Diese negative Ladung resultiert - wie neueste Erkenntnisse vermuten lassen (KANEKO 1984) - aus der Anwesenheit kovalent gebundener Glykoproteine, besonders mit Sialinsäureresten an der Oberfläche der Spermatozoen. Grundvoraussetzung der elektrophoretischen Trennung sind unterschiedliche Oberflächenladungen auf X- und Y- Spermatozoen, die für die Migration der Samenzellen im elektrischen Feld verantwortlich sind. Es handelt sich dabei nicht um motilitätsabhängige aktive Bewegungen der Spermatozoen, sondern um eine passive Ablenkung aufgrund der Potentialdifferenz in der elektrophoretischen Kammer. Schon 1933 postulierte SCHRÖDER nach ersten Versuchen mit Tierspermatozoen im elektrischen Feld die Existenz solcher unterschiedlichen Oberflächenladungen. SCHEGALOFF und MACHOWKA (1935) beschrieben eine unterschiedliche Wanderung von Spermatozoen zur Anode bzw. Kathode, wenn sie einem elektrischen Feld ausgesetzt sind.

Die neuesten Ergebnisse auf diesem Gebiet von KANEKO et al. (1983/84) unter Verwendung der modernsten Apparaturen zur Free- Flow- Elektrophorese wollen zeigen, daß mit dieser Methode eine prozentuale Anreicherung von X- bzw. Y- Spermatozoen beim Menschen möglich ist. Bei ihren Experimenten wandern zwar beide Populationen in Richtung Anode, X- Chromosomen- tragende Samenzellen jedoch schneller, d.h. sie besitzen eine größere elektrophoretische Beweglichkeit. Mit diesen Ergebnissen widersprechen sie jedoch grundlegend den früheren Experimenten mit Humansperma von SHIRAI et al. (1974), die den Y- Spermatozoen die größere Anodenaaffinität zusprechen und außerdem den elektrophoretischen Trennversuchen mit Bullensperma von SCHILLING und HANNIG (1969).

2.4. Methoden zur Selektion motiler Spermatozoen

In der andrologischen Forschung und Klinik ist es oft notwendig, den Anteil der motilen Samenzellen in einem Ejakulat zu erhöhen. Pharmatoxologische Untersuchungen an Spermatozoen z.B. erfordern als Ausgangsmaterial progressiv motile Samenzellen für ihre Messungen. In der Praxis werden vor allem Ejakulate mit pathologisch verminderten Motilitätsraten oder auch Kryosperma mit verschiedenen Methoden behandelt, mit dem Ziel, die Qualität der Spermatozoen und besonders ihre Motilitätsraten zu verbessern. Im folgenden werden einige Techniken zur Selektion motiler Samenzellen kurz charakterisiert:

- Die Filtration durch Glaswolle, wie sie von PAULSON (1979) beschrieben wird, bewirkt eine Reinigung des Ejakulats von toten, unbeweglichen und abnormen Spermatozoen. Von Nachteil ist, daß auch progressiv bewegliche Samenzellen bis zu 50% abfiltriert werden, außerdem können Beschädigungen an den Zellwänden auftreten.
- Die Filtration durch visköse Medien wie z.B. Percoll (KANEKO et al. 1983), Ficoll (KANEKO et al. 1980), Sephadex (QUINLIVAN et al. 1982) und Albumin (ERICSSON et al. 1973) nützen die Filterwirkung von Gelen und Proteinen gegen unbewegliche Spermatozoen. Diese Verfahren sind weniger traumatisierend für die Zellen als die Filtration durch Glaswolle, sind aber auch mit hohen Einbußen auf die Spermatozoenzahl verbunden.
- Die Sperm Rise Techniques oder auch Swim-up Verfahren (DREVIUS 1971, MAKLER et al. 1984) werden in zahlreichen Variationen durchgeführt. Das Prinzip ist jedoch identisch: Das Ejakulat wird nach erfolgter Verflüssigung bzw. nach einmaligem Waschen in Tyrode schonend zentrifugiert und anschließend an einem ruhigen Standplatz inkubiert. Die progressiv beweglichen Spermatozoen haben nun Zeit das Sediment zu verlassen und können mit dem Supernatant entnommen werden.
- Eine neue Methode ist die Migrations-Sedimentations-Technik (TEA et al. 1983). Sie ist Teil dieser Arbeit (siehe S.54).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL

3.1.1. Herkunft der Ejakulate

Sämtliche Samenproben stammen von Patienten der andrologischen Sprechstunde aus der Dermatologischen Universitätsklinik München. Es handelte sich ausnahmslos um Ejakulate mit Normalbefund.

3.1.2. Reagenzien und Serata

Alle Reagenzien, die im Text ohne Angabe der Herkunft erwähnt werden, sind Produkte der Fa. Merck, Darmstadt, bei allen übrigen Stoffen ist die Bezugsquelle in Klammern angegeben.

3.1.3. Technische Ausrüstung

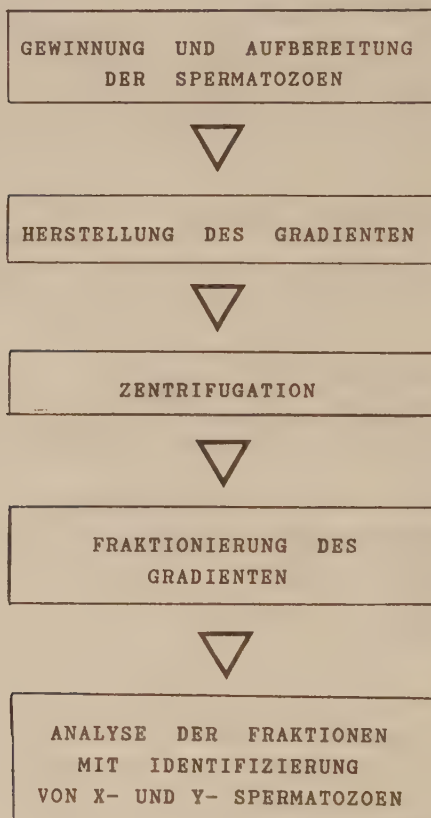
Neben dem üblichen Laborbedarf wurden folgende Geräte verwendet:

Zentrifuge (Heraeus Christ Minifuge 2),
Phasenkontrastmikroskope (Zeiss, Olympus),
Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop mit Mikrofotoeinrichtung (Zeiss),
Bildanalyse-Computer zur Motilitätsbestimmung (Brunner),
Free-Flow-Elektrophoresegeräte (Bender & Hobein, Hirschmann),
Osmometer (Knauer),
PH-Meter (WTW),
Waage (Mettler Pl200).

3.2. METHODEN

3.2.1. Dichtegradientenzentrifugation von menschlichen Spermatozoen

Die erforderlichen Arbeitsgänge lassen sich in folgendem Schema darstellen:



3.2.1.1. Gewinnung und Aufbereitung der Spermatozoen

Durch Masturbation gewonnene Patienten- bzw. Spenderejakulate wurden nach einer Verflüssigungszeit von 30 min auf ihre Qualität hin untersucht (SCHIRREN 1982). Es wurde darauf geachtet, daß die Samenzellen aus einem einzelnen Ejakulat gewonnen wurden und eine Gesamtzahl von 200 Millionen nicht unterschritten wurde. So war gewährleistet, daß individuelle Dichteunterschiede bei Spermatozoen verschiedener Spender die Auftrennung nicht verfälschten und sich in jeder Bande eine präperative Menge von Samenzellen befand.

Die Ejakulate wurden zunächst mit Tyrodelösung (siehe S. 46) verdünnt und dann bei 1000 U/min (120 g) für 15 min zentrifugiert. Die so gewaschenen Spermatozoen wurden daraufhin in einer 20%igen, isotonen Percoll^R-Lösung aufgenommen, bei 1000 U/min für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 2 ml 20%igem Percoll^R resuspendiert. Dieser Zwischenschritt soll den Eintritt der Samenzellen in das Gradientenmedium schonender gestalten.

Die 20 %ige Percoll^R-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt:

2	Teile Percoll ^R	+
1	Teil einer 10-fach hypertonen Lösung (hier: Tyrode, 10-fach konzentriert)	+
7	Teile H ₂ O	

3.2.1.2. Herstellung der Gradienten

Als Gradientenmedium wurde das bereits oben erwähnte Produkt PERCOLL^R der Firma Pharmacia, Sweden, verwendet.

Durch folgenden Arbeitsgang wurde eine gebrauchsfertige Percoll^R-Lösung mit definierter Dichte hergestellt:

1 Teil einer 10-fach konzentrierten isotonen Lösung +
 (z.B. eine 1,5 M NaCl-Lösung = 9 %ig)
 9 Teile (V_0 + dest. Wasser)

V_0 ist die Menge unverdünntes Percoll^R, die der Dichte der Endlösung entspricht. Sie wird durch folgende Formel errechnet (PHARMACIA 1980):

$$V_0 = V \frac{\rho - 0,1 \rho_{10} - 0,9}{\rho_0 - 1}$$

V = Volumen der Endlösung ml
 ρ = Dichte der Endlösung g/ml
 ρ_0 = Dichte von Percoll^R g/ml
 ρ_{10} = Dichte einer 1,5 M NaCl-Lösung = 1,058 g/ml

Bei einem Endvolumen $V = 100$ ml ergab sich folgende Zusammensetzung der Gradientenlösungen:

Dichte in g/ml	NaCl-lsg.in ml	V_0 in ml	dest.H ₂ O in ml
1,04	10	26,2	63,8
1,06	10	41,5	48,5
1,07	10	49,2	40,8
1,08	10	56,9	33,1
1,09	10	64,6	25,4
1,10	10	72,3	17,7
1,11	10	80,0	10,0
1,12	10	87,7	2,3

Es wurden nun jeweils 4,0 ml einer Gradientenlösung mit einer 5 ml Glaspipette in einem Kunststoff-Zentrifugenröhrchen von 35 ml Fassungsmenge aufgeschichtet. Man beginnt mit dem Medium der höchsten Dichte und schichtete das nächst leichtere darüber. Man muß sehr langsam und erschütterungsfrei pipettieren, um eine Durchmischung der einzelnen Banden zu vermeiden. Der so entstandene diskontinuierliche Gradient wurde mit der Probe beladen.

3.2.1.3. Zentrifugation der Gradienten

Die Gradienten wurden nun für 40 min bei 1200 U/min (250 g) und Raumtemperatur zentrifugiert.

Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit wurden anhand von Vorversuchen empirisch ermittelt.

3.2.1.3.1. Vorversuche

Zur Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen dienten folgende Experimente:

Vorversuch A:

Bestimmung der optimalen Zentrifugationsgeschwindigkeit und ihr Einfluß auf die Motilität, bei einer konstanten Zentrifugationsdauer $T = 30$ min.

Was man laienhaft ausgedrückt unter der Rotations- oder Zentrifugationsgeschwindigkeit einer Zentrifuge (angegeben in U/min) versteht, ist streng physikalisch gesehen die Zentrifugationsfrequenz f_z . Wie die folgende Beziehung zeigt,

$$F_z = m \cdot 4 \pi^2 r f_z^2 = m \cdot a_z \quad \langle N \rangle;$$

F_z Zentrifugalkraft = Trägheitskraft bei Drehbewegung	$\langle N \rangle$
m Masse der Substanz auf die die Kraft wirkt	$\langle kg \rangle$
r Radius der Kreisbahn	$\langle m \rangle$
f_z Frequenz der Zentrifuge	$\langle s^{-1} \rangle$
a_z Zentrifugalbeschleunigung	$\langle m \cdot s^{-2} \rangle$

ist das Quadrat der Zentrifugationsfrequenz f_z direkt proportional zur Zentrifugalkraft F_z , der die Spermatozoen bei der Zentrifugation ausgesetzt sind. Durch Einführung der Zentrifugalbeschleunigung a_z in die Formel, läßt sich der Ausdruck auch für unterschiedliche Zentrifugen (mit unterschiedlichen Radien) objektivieren. Die Zentrifugalbeschleunigung wird meist als ein Vielfaches der Erdbeschleunigung g ausgedrückt.

Es sollen nun die Auswirkungen der Zentrifugalkraft auf die Motilität der Spermatozoen untersucht und die optimale Zentrifugationsgeschwindigkeit empirisch ermittelt werden. Wie in 3.2.1.2. beschrieben, wurden 10 Gradienten vorgefertigt, mit identischen Spermatozoenmengen beladen und über eine Dauer von 30 min bei 500, 1000, 1500, 2000 und 2500 U/min zentrifugiert (dies entspricht relativen Beschleunigungswerten von 40, 160, 350, 630 und 980 g, nach obiger Formel errechnet). Die Gradienten wurden anschließend auf-fractioniert (siehe 3.2.1.4.), die Spermatozoen /Fraktion in einem Häemocytometer ausgezählt und dabei auf ihre Gesamt-motilität hin untersucht.

Vorversuch B:

Bestimmung der optimalen Zentrifugationsdauer T und ihr Einfluß auf die Motilität, bei einer konstanten Zentrifugationsgeschwindigkeit $w = 1200$ U/min (250 g).

Folgende Annahmen wurden diesem Experiment zugrundegelegt:

- (1) Zu kurze Zentrifugationszeiten erlauben den Spermatozoen nicht ihr Dichteniveau zu erreichen.
- (2) Bei zu langer Zentrifugationsdauer könnte die Eigenbeweglichkeit der Spermatozoen das Trennergebnis verfälschen, bzw. die längere physikalische Belastung könnte den Samenzellen schaden.

Wieder wurden 10 Gradienten wie oben beschrieben hergestellt, mit Spermatozoen beladen und über eine Zeitdauer von 10, 20, 30, 40 und 50 min bei konstant 1200 U/min zentrifugiert. Es wurde darauf geachtet, daß sich in jedem der Versuchsansätze eine vergleichbare Menge von Samenzellen befand (300 Mill. ± 10 %). Danach erfolgte die Auftrennung in die 8 Fraktionen. Durch Auszählung in einem Häemocytometer wurde wieder die Zahl der Spermatozoen /Fraktion bestimmt und daraus das Verteilungsmuster der Spermatozoen im Gradienten ermittelt. Die Bestimmung der Gesamt-motilität erfolgte ebenfalls wie in Vorversuch A.

3.2.1.3.2. Kontrolle des Sedimentationsvorgangs beim Zentrifugieren

Dieser Vorgang kann mit Hilfe von Density Marker Beads (Pharmacia, Sweden) kontrolliert werden. Es handelt sich dabei um farbige Partikel, Derivate von Sephadex^R, die genormte Dichten aufweisen und dadurch im Gradienten distinkte Zonen bilden. Mit Hilfe einer Tabelle lassen sich diese farbigen Banden den zugehörigen Dichten zuordnen. Dies erlaubt eine Kalibrierung des verwendeten Gradienten und bietet eine optische Kontrollmöglichkeit des Sedimentationsvorgangs. Die Density Marker Beads wurden auf einen gesonderten Gradienten aufgetragen und mit den Proben-Gradienten mitzentrifugiert.

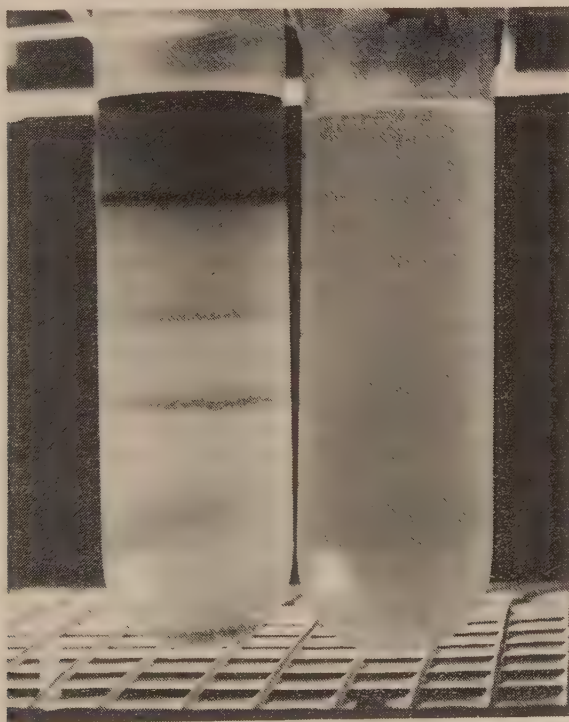


Abb.4: Density Marker Beads

3.2.1.4. Fraktionierung der Gradienten

Nun müssen die einzelnen Gradienten wieder voneinander getrennt werden, was durch schichtweises Absaugen von oben mit Hilfe einer Pipette geschehen kann. Dieser Arbeitsgang wurde mit besonderer Vorsicht vollzogen, da eine Vermischung der Gradienten in dieser Phase die Ergebnisse verfälschen würde. Es wurden unter Berücksichtigung der aufgeschichteten Probenmenge zuerst 6 ml und in der Folge dann jeweils weitere 4 ml aus dem Zentrifugenröhrchen abgesaugt. Auf diesem Wege erhält man 8 einzelne Fraktionen.

3.2.1.5. Analyse der Fraktionen

Dichtemessungen dieser Fraktionen bestätigten, daß es sich dabei wieder um die vorher eingesetzten Gradienten handelte. Die Spermatozoen in den einzelnen Fraktionen mußten nun vom Gradientenmedium befreit werden, da Percoll^R mit der Fluoreszenzfärbung der Y-Chromosomen interferiert (KANEKO et al. 1983). Dies geschah durch dreimaliges Waschen in Tyrodelösung. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet in 1 ml Tyrode aufgenommen und die Spermatozoendichte im Häemocytometer bestimmt. Zur Ermittlung von progressiver und ortsbeweglicher Motilität wurden jeweils 100 Spermatozoen im Häemocytometer beobachtet und nach ihrer Eigenbeweglichkeit eingeteilt. Von jeder Fraktion wurden nun Ausstriche angefertigt und an einem staubgeschützten Ort luftgetrocknet.

3.2.1.6. Identifizierung der aufgetrennten Spermatozoen

Die Unterscheidung in X- oder Y-Chromosomen-tragende Spermatozoen erfolgte durch die Fluoreszenzfärbung mit Quinacrin-derivaten (siehe 2.1.4.). Vergleicht man die in der Fachliteratur zahlreich vertretenen Modifikationen dieser Färbemethode miteinander, so unterscheiden sie sich zwar geringfügig in der Dauer der Spül- und Färbezeiten, jedoch nicht in ihrem Ablauf. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Modifikationen angewandt, die kurz als Färbung (1) und (2) bezeichnet wurden:

Färbung (1):

Es handelt sich um eine einfache Färbungsmethode mit Quinacrine Mustard.

- Lufttrocknung der Ausstriche an einem staubfreien Ort (am besten über Nacht).
- Fixierung in absolutem Methanol 30 min
- Überführen in 70 %igen Methanol 5 min
- Überführen in Mc Ilvaine Puffer pH 4,5 5 min
- Färben in wässriger Quin. Mustard Lösung 0,005 % 5 min
- Auswaschen in Mc Ilvaine Puffer pH 4,5 5 min
- Überführen in Phosphatpuffer pH 7,4 , eindeckeln und an einem dunklen Ort aufbewahren
- möglichst bald mikroskopieren

Färbung (2):

Mit dieser von LUECK und ZANEVELD (1977) beschriebenen Methode wurde erst später gearbeitet. Sie ist durch eine Kombination von Quinacrine Mustard und Quinacrindihydrochlorid gekennzeichnet.

Der etwas umständlichere Ablauf wirkt sich dabei positiv auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus.

- Lufttrocknen der Ausstriche an einem staubfreien Ort
- Fixierung in 100 %igem Äthanol 5 min
- Überführen in 95 %igen Äthanol 2 min
- Überführen in 70 %igen Äthanol 2 min
- Überführen in Phosphat-Citrat Puffer pH 6,8 2 min
- Färbung in 1 %iger Quinacrin-Dihydrochlorid Lösung, die mit K MnO₄ vorbehandelt wurde 20 min
- 3 x Waschen in Phosphat-Citrat Puffer pH 6,8 je 5 min
- Färbung in wässriger Quinacrine Mustard Lösung (250 ug/ml) 5 min
- 3 x Waschen in Phosphat-Citrat Puffer pH 6,8 je 5 min
- Eindeckeln in Saccharose-Puffer-Medium und dunkel lagern
- möglichst bald mikroskopieren

Beide Färbemethoden wurden auf ihre Effektivität und Reproduzierbarkeit untersucht.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 Ejakulate gefärbt und der prozentuale Anteil an identifizierbaren F-bodys ausgezählt. Färbung (1) ergab einen durchschnittlichen Prozentsatz von 44,2 % F-bodys, 2 der 10 Präparate waren etwas zu schwach angefärbt, ließen sich aber noch auswerten.

Bei Färbung (2) wurden 45,9 % F-bodys erreicht, wobei alle 10 Präparate gleichmäßig angefärbt erschienen.

Die X- Y- Identifizierung der Spermatozoen bei den Experimenten zur Dichtegradientenzentrifugation erfolgte anfangs durch Färbung (1), bei späteren Versuchen durch Färbung (2).

Durch Auszählung von 100 Spermatozoen wurde der prozentuale Anteil an F-bodys ermittelt.

3.2.1.7. Trennversuche

Die Experimente wurden in drei Gruppen aufgeteilt:

In Gruppe (1) wurden 20 Ejakulate verschiedener Spender nach obiger Methode aufgetrennt und untersucht. Die Isotonität des Gradientenmediums wurde bei diesen Versuchen mit einer 10fach konzentrierten Tyrode-Lösung anstelle der 1,5 M NaCl-Lösung sichergestellt, um dem natürlichen Milieu der Spermatozoen zu entsprechen.

Aus der Überlegung heraus, daß durch Adhäsionskräfte an den Wänden der Zentrifugengefäße einige Spermatozoen haften bleiben, dadurch nicht ordnungsgemäß sedimentieren und so das Trennergebnis möglicherweise verschlechtern könnten, wurden die Experimente der zweiten Gruppe geringfügig modifiziert:

Gruppe (2) umfaßt weitere 10 Versuche mit dem Zusatz von 0,1% Humanserumalbumin zum Gradientenmedium. Die Zentrifugengefäße wurden vor diesen Versuchen zusätzlich über 3 Stunden mit einer 3 %igen Albuminlösung beschichtet.

Darüberhinaus war die Durchführung der Experimente in allen Punkten identisch mit den Versuchen der Gruppe (1).

Den Experimenten in Gruppe (3) dagegen lag eine andere Zielsetzung zugrunde.

Wie die Ergebnisse aus den Vorversuchen A und B bereits vermuten lassen (siehe S. 58-62), wandern die Spermatozoen durch ihre Eigenbeweglichkeit im Gradienten in Richtung der dichteren Fraktionen. Bei einer Dichtegradientenzentrifugation unter den oben genannten Bedingungen, jedoch mit einer maximalen Dichte von 1,09 g/ml, sind folgende Ergebnisse zu erwarten:

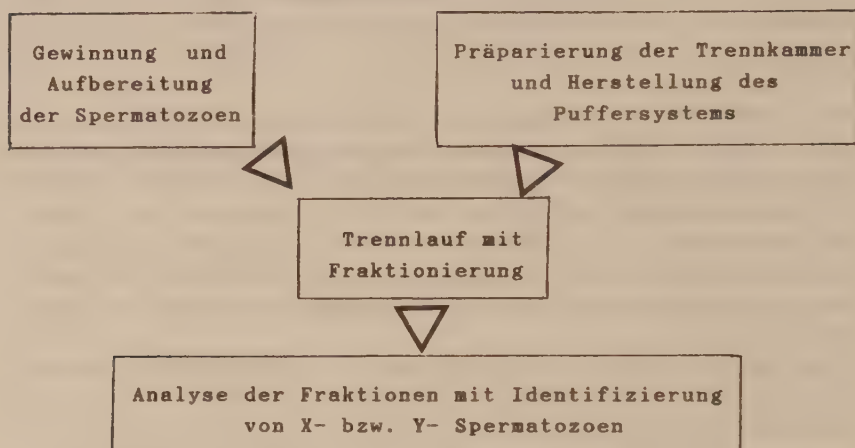
- Der Großteil der Samenzellen müßte sich nach Durchwanderung der letzten Dichtestufe von 1,09 g/ml als Sediment am Boden des Zentrifugengefäßes absetzen.
- Da die Wanderung der Spermatozoen zum einen auf die Gravitationskraft, zum anderen auf ihre progressive Beweglichkeit zurückzuführen ist, müßte die Motilitätsrate der sedimentierten Spermatozoen die Ausgangsmotilität des Ejakulats übersteigen.
- Eine Trennung in X- und Y- Spermatozoen ist bei Verwendung eines "sanften" Gradienten, wie in diesem Fall, nicht zu erwarten.

Es sollte nun überprüft werden, ob die Gradientenzentrifugation auch eine geeignete Methode zur Reinigung und Motilitätsanreicherung von Ejakulaten darstellt.

Zu diesem Zweck wurden weitere 10 Versuche, wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch unter Verwendung der Gradientenstufen 1,04, 1,05, 1,06, 1,07, 1,08, 1,09 (g/ml) und in bekannter Weise ausgewertet.

3.2.2. Die elektrophoretische Trennung von menschlichen X- und Y- Spermatozoen

3.2.2.1. Schematische Darstellung der Arbeitsvorgänge



3.2.2.2. Die Free- Flow- Elektrophorese- Apparatur

Das von HANNIG entwickelte Verfahren der Free- Flow- Elektrophorese erlaubt eine Zelltrennung mit Hilfe einer trägerfreien Ablenkungselektrophorese. Die Trennung erfolgt in einer senkrecht stehenden Kammer, in der sich ein laminarer Pufferstrom gleichmäßig von oben nach unten bewegt. Zu beiden Seiten der Kammer befinden sich die Elektroden, welche ein elektisches Feld in horizontaler Richtung, also senkrecht zum Pufferstrom, aufbauen. Ein Elektrodenpuffer mit hoher elektrischer Leitfähigkeit umspült und kühlt die Elektroden und steht mit dem Kammerpuffer, der eine niederere Leitfähigkeit aufweist, über Membranen in Verbindung.

Das zu trennende Material wird mit Hilfe einer Dosierpumpe in den oberen Bereich der Trennkammer eingebracht und nach Durchlaufen des Feldes in Fraktionen aufgefangen. Die Trennexperimente wurden nacheinander mit zwei unterschiedlichen Free- Flow- Elektrophorese- Apparaturen durchgeführt und werden hier auch getrennt beschrieben.

3.2.2.3. Elphor VaP 21 , Bender & Hobein, München

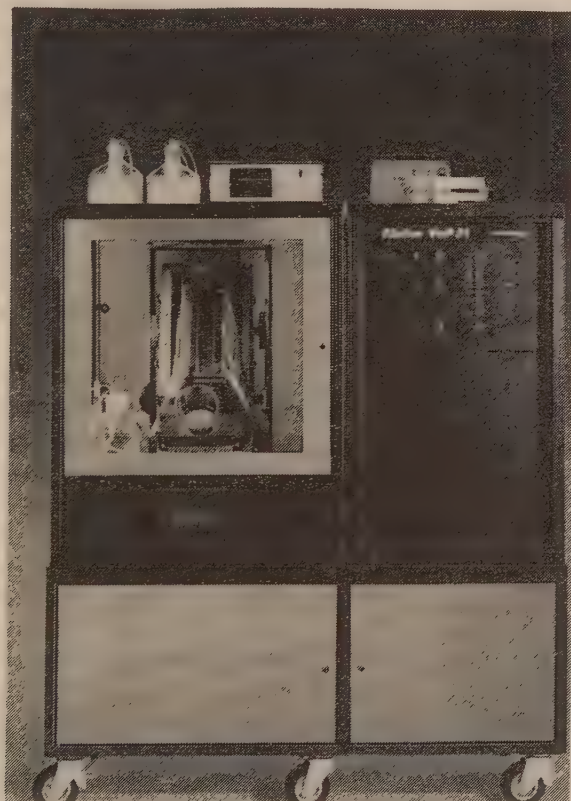


Abb.5: Elphor VaP 21

3.2.2.3.1. Gerätebeschreibung

Das in Abb.5 dargestellte Gerät ist eine Ausführung für präparative Zwecke, die einen hohen Pufferdurchfluß ermöglicht und eine hohe Trennkapazität aufweist. Der Kammerpuffer erreicht den Trennbereich über 7 regelmäßig angeordnete Einlässe, der Puffereinstrom (input) wird über eine stufenlos verstellbare Schlauchpumpe kontrolliert. Die Trennkammer mit einer Dimension von 200 mm (Breite) x 250 mm (Länge) x 0,5 (verstellbar bis 1,0)mm (Tiefe) hat eine Frontplatte aus Plexiglas, die Rückwand besteht aus einer dünnen Glasfläche, gestützt durch eine verspiegelte Metallplatte, die gleichzeitig als Kühlplatte dient. Eine thermostatische Regeleinrichtung kann die Temperatur auf $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ konstant halten. Die Trennkammer ist um 90° schwenkbar und kann durch eine schmalere Version (100 mm Breite) ersetzt werden. Das Absaugen des Pufferstroms erfolgt durch eine 90-fach Schlauchpumpe mit kontinuierlich regelbarer Förderleistung (der Pufferausstrom wird als flow rate bezeichnet). Die Schläuche münden in 90 Auffanggefäße. Zum Einbringen der Trennprobe in die Kammer stehen mehrere Einlässe zur Verfügung, die Dosierung erfolgt über einen handelsüblichen Perfusor.

3.2.2.3.2. Gewinnung und Aufbereitung der Spermatozoen

Durch Masturbation gewonnene Ejakulate von Patienten der andrologischen Sprechstunde wurden nach einer Verflüssigungszeit von 30 min auf ihre Qualität hin untersucht. Die Ejakulate mußten eine Gesamtspermatozoenzahl von mindestens 60 Mio./ml und eine Gesamtmotilität von über 40 % aufweisen.

Nach Zugabe von Kammerpuffer wurden die Ejakulate für 15 min bei 800 U/min (120 g) zentrifugiert und das Pellet in Kammerpuffer aufgenommen, wobei die Spermatozoendichte nicht unter 40 Mio./ml liegen sollte.

Um die Spermatozoen nicht unnötig niedrigen Temperaturen auszusetzen, wurden Gefäße und Flüssigkeiten auf 25°C vorgewärmt.

3.2.2.3.3. Vorbereitung der Trennkammer

Die Kammer muß vor Inbetriebnahme gereinigt werden, Dichtungen und Membranen müssen gemäß der Herstellerangaben auf ihren Zustand überprüft werden.

Ein Beschichten der Kammer mit Albumin entfällt, da die Innenflächen der Trennkammer bereits werksmäßig mit Silikon bedampft wurden.

Die Kammer wird von oben gefüllt, wobei auch alle input-Schläuche unter Reverse-Stellung entlüftet werden müssen. Ist das System luftblasenfrei, werden alle Einfüllschläuche in das Kammerpuffer-Vorratsgefäß gebracht und danach die flow rate auf einen mittleren Wert eingestellt. Füllen sich nicht alle Fraktionierungsschläuche ordnungsgemäß, müssen die undurchlässigen Ableitungen gereinigt oder ausgetauscht werden.

Um einen konstanten, laminaren Pufferstrom zu gewährleisten, müssen input (Puffereinstrom) und flow rate (Pufferausstrom) genau aufeinander abgestimmt werden. Dazu wird in alle Probeneinläufe eine Farbstofflösung (Methylenblau in Puffer) injiziert, die flow rate auf den gewünschten Pufferdurchsatz eingestellt und dann der input so lange verändert, bis die Farbstoffbanden ohne Turbulenzen und absolut parallel durch die Kammer strömen. Diese Eichung muß bei jeder Änderung der Pufferdurchlaufgeschwindigkeit oder des Puffersystems (unterschiedliche Viskositäten!) erneut vorgenommen werden.

3.2.2.3.4. Herstellung und Wahl des Puffersystems

Bei der Wahl des Puffersystems müssen folgende, zum Teil gegensätzliche Forderungen berücksichtigt werden:

- Um eine hohe elektrophoretische Beweglichkeit und eine geringe Hitzeentwicklung in der Trennkammer zu erreichen, ist ein Kammerpuffer mit einer niedrigen elektrischen Leitfähigkeit erwünscht (ZEILLER et al. 1975).
- Zur Erhaltung der Zellvitalität wird dagegen ein isotoner Puffer gefordert, der eine hohe elektrische Leitfähigkeit aufweist.

- Der pH - Wert des Puffers muß den physiologischen Bedingungen angepaßt sein.
- Der Puffer muß iso-osmotisch, entsprechend dem Seminalplasma eingestellt werden.

Die ersten Versuche wurden mit einem Kationen-Trennpuffer auf Triethanolaminbasis gemacht, der bei der Trennung von biologischem Material, wie Zellen, Zellorganellen oder Bakterien mit Erfolg eingesetzt wird. Dieses, hier unter Puffersystem (1) beschriebene Trennmedium, hat jedoch den Nachteil einer sehr geringen Ionenstärke, was auf Kosten der Zell-Überlebensrate gehen kann. Die erforderliche Osmolalität von 300 mOsmol/l wurde durch Zugabe von Fruktose erreicht.

Puffersystem (2) dagegen hat als Elektrodenpuffer immer noch Triethanolamin zur Grundlage, der Kammerpuffer jedoch besteht aus einer 1:5 Verdünnung der bekannten modifizierten Tyrode mit Hepes als Puffersubstanz und ist dem natürlichen Spermatozoenmilieu eher angepaßt. Eine höhere Ionenstärke muß dafür in Kauf genommen werden.

Das dritte Trennmedium, Puffersystem (3), ist eine Kombination auf Hepesbasis, die seit 1984 von KANEKO et al. verwendet wird.

Bei allen Puffersystemen ist die elektrische Leitfähigkeit des Elektrodenpuffers ca. 3 mal so hoch, als die des Kammerpuffers. Dies ist notwendig, da sich der Elektrodenpuffer in einem Kreislauf befindet und im Laufe der Zeit an Ladungen (Ionen) verarmt.

Puffersystem (1)

Elektrodenpuffer:

5 mM Triethanolamin (Fluca)

mit Essigsäure auf pH 7,4 titriert

+ Fruktose bis Osmolalität = 300 mOsmol/l (ca. 60 g/l)

+ Na- acetat bis el. Leitfähigkeit = 0,80 mS/cm

Kammerpuffer:

5 mM Triethanolamin

mit Essigsäure auf pH 7,4

+ Fruktose bis Osmolalität = 300 mOsmol/l

elektrische Leitfähigkeit: 0,25 mS/cm

Puffersystem (2)

Elektrodenpuffer:

400 mM Triethanolamin

mit Essigsäure auf pH 7,4

+ Fruktose bis Osmolalität = 300 mOsmol/l

elektrische Leitfähigkeit: 10,8 mS/cm

Kammerpuffer : (modifizierte Tyrode 1:5 verdünnt)

1,60 g NaCl

0,04 g KCl

0,20 g NaHCO₃

0,71 g Hepes (Sigma)

getrennt lösen:

52,0 mg CaCl₂ x 2H₂O

42,4 mg MgCl₂ x 6H₂O

7,2 mg Na- pyruvat

ad 1000 ml H₂O

mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

+ Fruktose bis Osmolalität = 300 mOsmol/l

elektrische Leitfähigkeit: 3,6 mS/cm

Puffersystem (3)

Elektrodenpuffer:

100 mM Hepes (Sigma)

80 mM NaCl

mit NaOH auf pH 7,4 titriert

Osmolalität: 305 mOsm/kg H₂O

elektrische Leitfähigkeit: 8,8 mS/cm

Kammerpuffer:

10 mM Hepes

30 mM NaCl

250 mM Saccharose

1,0 g/l Humanserumalbumin (Sigma)

mit NaOH auf pH 7,4 titriert

Osmolalität: 312 mOsm/kg H₂O

elektrische Leitfähigkeit: 3,2 mS/cm

3.2.2.3.5. Vorversuche

Vorversuch A:

Der Einfluß verschiedener osmotischer Expander auf die Motilitätsrate:

Um die Iso-Osmolalität eines Puffer mit niedriger Ionenstärke zu gewährleisten, müssen osmotische Expander eingesetzt werden. In Frage kommen elektrisch neutrale Stoffe mit einem geringen Molekulargewicht und möglichst geringen Einfluß auf die Viskosität des Puffers. ZEILLER et al.(1975) untersuchten verschiedene Substanzen, die diese Forderungen erfüllen und überprüften ihren Einfluß auf die elektrophoretische Beweglichkeit und die Überlebensrate von Zellen (Erythrozyten und lymphatische Zellen von Ratten). Demnach hat Glycin, eine Aminosäure, die zwar die dielektrische Konstante des Mediums (in diesem Fall ein Triethanolamin-Puffer) erhöht, dafür aber die Viskosität nicht beeinflusst, Vorteile gegenüber Zuckern. Letztgenannte, z.B. Saccharose, sind elektrisch neutral, erhöhen aber die Viskosität des Mediums. In Bezug

auf die elektrophoretische Beweglichkeit können diese Ergebnisse vermutlich auch auf menschliche Spermatozoen übertragen werden. Ob dies auch auf die Überlebensrate zutrifft (Spermatozoen stellen als bewegliche Zellen andere Anforderungen an ihr Milieu), sollte durch nachfolgende Experimente geklärt werden.

Als Indikator für die Vitalität der Spermatozoen dient die Motilitätsrate.

5 mmolarer Triethanolamin-Acetat-Puffer, auf pH 7,4 eingestellt, wurde jeweils mit

- Glycin,
- Glucose,
- Fructose und
- Saccharose

bis zu einer Osmolalität von 300 mOsmol/l versetzt. Dadurch wurden 4 verschiedene Puffer-Expander-Kombinationen hergestellt.

2 Ejakulate mit bekannten Ausgangsmotilitäten wurden gesplittet, jede Fraktion in einer anderen Puffer-Expander-Kombination gewaschen und anschließend bei 25 °C inkubiert.

Nach jeweil 2 und 4 Stunden wurden die Motilitätsraten nach der Schätzmethode bestimmt (siehe 2.1.1.2.).

Vorversuch B:

Puffersysteme und ihr Verhalten im elektrischen Feld:

Um reproduzierbare Trennergebnisse zu erzielen, ist ein über den gesamten Trennbereich konstantes elektrisches Feld erforderlich (ZEILLER et al. 1975). Unregelmäßigkeiten in der Kontinuität des Feldes sind nicht nur die Folge von defekten Membranen, sondern können ihre Ursache auch in ungünstigen Ionenverschiebungen in Kammer- und/oder Elektrodenpuffer haben. Die nachstehenden Experimente sollen Aufschluß über die Homogenität des elektrischen Feldes bei den drei oben genannten Puffersystemen geben.

Mit den verschiedenen Puffersystemen wurden Probeläufe unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Der Pufferstrom wurde in 90 Fraktionen aufgeteilt und jede Fraktion auf den pH-Wert und die elektrische Leitfähigkeit untersucht. Es herrschten folgende Versuchsbedingungen:

Puffersystem (1):	Puffersystem (2):	Puffersystem (3):
U = 980 V +/- 3%	U = 940 V +/- 2%	U = 1000 V +/- 4%
I = 23 mA	I = 240 mA	I = 220 mA
T = 20 °C	T = 20 °C	T = 20 °C
flow rate: 1,0	flow rate: 1,0	flow rate: 1,0
input: 40	input: 40	input: 40

U = elektrische Spannung an den Elektroden

I = Stromstärke

T = eingestellte Kammertemperatur

3.2.2.3.6. Trennexperimente

Die ersten Trennexperimente wurden mit gepoolten Ejakulaten durchgeführt, um eine möglichst große Menge an Spermatozoen zur Verfügung zu haben. Bereits nach wenigen Versuchen stellte sich heraus, daß durch Wechselwirkungen zwischen den Spermatozoen verschiedener Spender eine hohe Agglomerationsrate verursacht wurde, die eine vernünftige Trennung nahezu unmöglich machte. Weiterhin mußte angenommen werden, daß die elektrophoretische Beweglichkeit der Samenzellen und damit das Verhalten im elektrischen Feld von Individuum zu Individuum unterschiedlich ist und somit ein Gemisch aus Spermatozoen mehrerer Spender ungenaue Trennergebnisse erwarten läßt. Aus diesen Gründen kamen diese Experimente nicht zur Auswertung.

Im Anschluß daran wurden ausschließlich Trennversuche mit Einzelejakulaten durchgeführt. Die Gewinnung und Aufbereitung der Spermatozoen, sowie die Vorbereitungen an der Elektrophoreseapparatur erfolgten bei allen Experimenten nach obenstehender Beschreibung.

Insgesamt wurden 31 Ejakulate verschiedener Spender zur Trennung ausgewählt. Die ungepufferten Spermatozoen (siehe 3.2.2.3.2.) wurden in eine Perfusorspritze eingebracht und kontinuierlich über einen Kunststoffschlauch in die Trennkammer injiziert.

Zu Beginn der Injektion lag keine elektrische Spannung an den Elektroden der Trennkammer, sodaß die Spermatozoenprobe im Pufferstrom eine senkrechte, gerade Bahn - ohne Ablenkung nach einer Seite - beschreiben mußte. Eine Abweichung von dieser geraden Strombahn deutete auf Turbulenzen hin und führte zum Abbruch des Experimentes.

Es sollten dann die optimalen Bedingungen für eine effektive Trennung ermittelt werden. Dies geschah empirisch durch Variation der Größen, die in den Trennvorgang eingreifen.

Folgende Parameter wurden verändert:

- Art des Puffers:

Zum Einsatz kamen die in 3.2.3.4. beschriebenen Puffersysteme. Bei den Puffersystemen (1) und (2) wurde zusätzlich mit der elektrischen Leitfähigkeit variiert.

Von den 31 Versuchen wurden

7 Trennläufe mit Puffersystem (1),

6 Trennläufe mit Puffersystem (2) und

18 Trennläufe mit Puffersystem (3) durchgeführt.

- Pufferdurchsatz in der Kammer (flow rate) und damit die Verweilzeit der Spermatozoen im elektrischen Feld:

Probiert wurden Pufferdurchsatzmengen von 130 ml/h (flow rate 0,5), was einer Verweilzeit von ca. 11 min entspricht, bis 550 ml/h (flow rate 2,0), wobei sich die Probe nur noch für ca. 2 min in der Kammer befindet.

- Probenmenge (sample input):

Der sample input rangierte zwischen 0,5 und 4,0 ml/h. Die Dosierung ist abhängig von der flow rate und der Spermatozoendichte in der Probe.

- Elektrische Feldstärke:

Die Spannung an den Elektroden wurde zwischen 500 V und 2000 V variiert. Die daraus resultierenden Feldstärken bewegen sich zwischen 25 V/cm und 100 V/cm.

- Temperatur:

Die Standardtemperatur für die Versuche lag bei 20 °C, jedoch wurde das elektrophoretische Verhalten im gesamten möglichen Temperaturbereich von 5 bis 25 °C ermittelt.

Um den Effekt jedes dieser Parameter auf den Trennvorgang zu charakterisieren, wurde nur jeweils eine Größe, unter Konstanthaltung der übrigen Parameter, variiert.

Da die Elektrophoreseapparatur nicht mit einem Detektionsgerät ausgestattet war, mußte die optische Beurteilung des Trennverlaufs nach subjektiven Maßstäben des Experimentators erfolgen.

Folgende Kriterien wurden dabei herangezogen:

- Verhalten der Spermatozoenprobe kurz nach der Injektion in die Kammer:

Eine Änderung der Perfusoreinstellung (sample input) verändert die Strömungsbreite der Probe. Bei zu hohem sample input und niedriger flow rate des Puffers kann sich die Probe in der Kammer aufstauen und Turbulenzen verursachen.

- Beobachtung des Strömungsverlaufs:

Die Wanderung der Probe in der Kammer muß in einer geraden Bahn (Bande) erfolgen. Wird die Strömungsgeschwindigkeit des Kammerpuffers (flow rate) verändert, entstehen zunächst Turbulenzen, die nach einiger Zeit bei richtiger Kombination von flow rate und input wieder einer laminaren Strömung Platz machen.

- **Grad der Ablenkung im elektrischen Feld:**

Bei Anlegen einer Spannung an die Elektroden der Trennkammer resultiert eine Ablenkung der Spermatozoenprobe. Sie ist abhängig von der elektrischen Feldstärke und der Verweildauer der Zellen im elektrischen Feld.

- **Bandenverbreiterung bzw. -auftrennung der Probe:**

Bereits ohne Einfluß eines elektrischen Feldes kann man eine geringe Verbreiterung der Spermatozoenbande beobachten. Sie entsteht aus parabolischen Strömungsprofilen des Pufferflusses, durch Thermodiffusion bei Temperaturgradienten und durch eine Differenz des Zeta-Potentials der Trennkammerwände gegenüber dem der Probe (HANNIG et al. 1975). Diesem ungewollten Phänomen steht die beabsichtigte Bandenverbreiterung durch die Auftrennung der zu separierenden Partikel gegenüber. Sie ist das einzige Kriterium zur Beurteilung der Trennung vor der Analyse der einzelnen Fraktionen. Auch sie ist, wie die Ablenkung der Bande, ein Resultat aus Feldstärke und Verweildauer im Feld.

- **Homogenität der Spermatozoenprobe:**

Während der Trennung wird das Spermatozoenmaterial auf seine Homogenität hin beurteilt. Die Bande soll eine gleichmäßige, milchige Trübung aufweisen. Die Bildung von Verklumpungen durch Zellagglutinationen bzw. -agglomerationen ist höchst unerwünscht.

3.2.2.3.7. Analyse der Fraktionen

Wenn nach den oben beschriebenen Kriterien eine Trennung zu erwarten war, wurde der auffraktionierte Pufferstrom über einen Zeitraum von mindestens 30 min in Glasröhrchen aufgefangen. Alle Fraktionen, die Spermatozoen enthalten konnten, wurden untersucht. Die Spermatozoendichte wurde im Häemocytometer bestimmt, die Beurteilung der Motilität erfolgte ebenfalls unter dem Phasenkontrastmikroskop.

3.2.2.3.8. Identifizierung der aufgetrennten Spermatozoen

Zur Differenzierung der F-body-tragenden Spermatozoen wurde die Färbemethode (1), wie in 3.2.1.6. beschrieben, verwendet.

3.2.2.3.9. Versuch der Spermatozoentrennung durch die Free- Flow- Isotachophorese

Bei der bisher beschriebenen Methode, handelte es sich um die kontinuierliche Free- Flow- (Zonen-)Elektrophorese, das gebräuchlichste Verfahren der trägerfreien Ablenkungselektrophorese. Daneben wurden noch weitere, speziellere Trennmethoden entwickelt, wie die Free- Flow- Feldsprung- Elektrophorese, die Free- Flow isoelektrische Fokussierung und die Free- Flow- Isotachophorese. Das zuletzt genannte Verfahren wurde in dieser Arbeit zur Spermatozoentrennung erprobt.

- Prinzip

In verschiedene Zonen der Trennkammer, werden jeweils ein Trennmedium mit dem sogenannten "leading ion", das zu trennende Substanzgemisch und ein Trennmedium mit dem "terminating ion" zugeführt. Das "leading ion" besitzt die größtmögliche elektrophoretische Beweglichkeit und bildet, unter dem Einfluß des elektrischen Feldes, die erste Zone. Ionen (aus der Probe) mit entsprechend geringerer Mobilität reichern sich in den nachfolgenden Zonen, bis hin zur Zone des "terminating ions" an, welches die geringste elektrophoretische Beweglichkeit aufweist.

Bei entsprechender Verweilzeit im Trennraum - im Durchschnitt 20 min - kann man nach Ende des Trennvorgangs in jeder Zone Anreicherungen von Substanzen mit gleicher elektrophoretischer Beweglichkeit präparativ auffangen.

Bei diesem Verfahren wird die zu trennende Substanz zusätzlich konzentriert und nicht verdünnt, wie bei der herkömmlichen Free- Flow- Elektrophorese .

Ziel der folgenden Versuche war es, den Effekt dieses Verfahrens auf das Trennverhalten menschlicher Spermatozoen zu untersuchen.

- Versuchsdurchführung

Mit einer Multikanal-Schlauchpumpe werden in die Trennkammer gleichzeitig die Probe, der Leading-Puffer und der Terminating-Puffer zugeführt. Auch die Elektrodenpuffer müssen aus Leading- bzw. Terminating-Puffer bestehen und zwei unabhängige Elektrodenpuffer-Kreisläufe müssen eine Kontamination der Elektrodenpülflüssigkeiten untereinander ausschließen. Auf die damit verbundenen technischen Abänderungen an der Apparatur wird hier nicht näher eingegangen.

Als Terminating-Puffer wurde ein Tris- β -Alanin-Puffer mit pH 8,8 verwendet. Er diente (erstens) als Kathoden-Puffer und gelangte (zweitens) durch den ersten, Kathoden-nahen Einlaß in die Trennkammer. Durch den zweiten Einlaß wurde die Spermatozoensuspension zugegeben. Die übrigen 6 Kammereinlässe wurden mit dem Leading-puffer, einem 0,005 M Tris-Cl-Puffer, pH 7,3, gespeist, der außerdem die Anode spülte.

Es wurden 5 Trennläufe mit 5 verschiedenen Ejakulaten unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Spannung: $U = 1260-1270 \text{ V}$
 Stromstärke: $I = 14 \text{ mA}$
 Temperatur: $T = 15,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 flow rate: 0,7
 input: 25
 Trenndauer: $t = 10-12 \text{ min}$

3.2.2.4. ACE 710 , Hirschmann, München

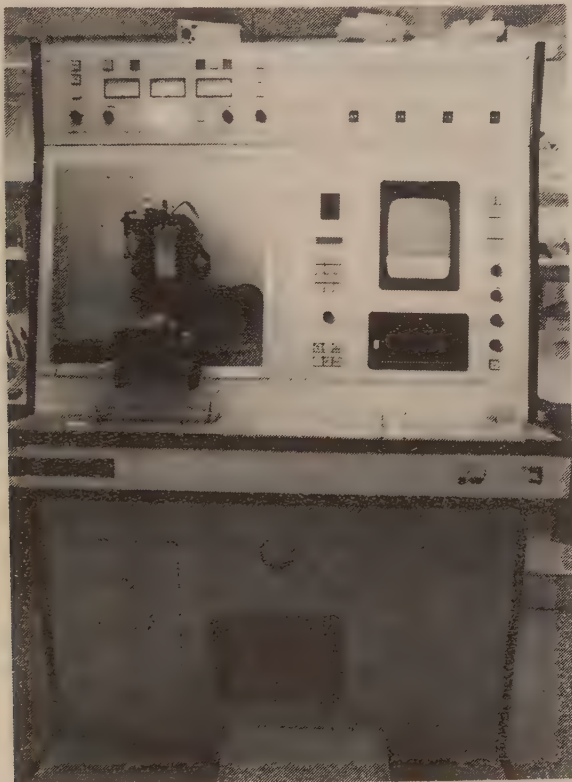


Abb.6: ACE 710

3.2.2.4.1. Gerätebeschreibung

Beim ACE 710 handelt es sich primär um eine analytisch ausgerüstete Version der Free- Flow- Elektrophoreseapparaturen, d.h. es genügen sehr kleine Probenmengen um messbare Trennungen durchzuführen. Das Kernstück des Gerätes, die Trennkammer, mißt 120 mm (Höhe) x 30 mm (Breite) x 0,3 mm (Tiefe).

Am Boden der Kammer befindet sich ein Fraktionierungskamm, der es erlaubt, den Pufferstrom samt zu trennende Probe in 35 einzelne Fraktionen aufzufangen. Vorher durchläuft der Puffer jedoch das optische Fenster (12 mm x 4 mm) einer Videokamera, die den Pufferstrom vergrößert und mit einem internen Computer gekoppelt ist. Das Trennprofil wird in Form eines Diagramms auf einem Monitor dargestellt und kann über einen eingebauten Plotter dokumentiert werden.

Die Detektion kann entweder im UV-Spektrum bei 225 nm (bei Verwendung des ACE 710 UV) oder im sichtbaren Bereich (ACE 710 VIS) erfolgen.

3.2.2.4.2. Gewinnung und Aufbereitung der Spermatozoen

Die Ejakulate wurden von Spendern bzw. Patienten unserer Abteilung nach einer sexuellen Karenzzeit von 3 bis 5 Tagen durch Masturbation gewonnen.

Es wurden nur Ejakulate verwendet, deren Parameter im Normbereich lagen (siehe S.5), besonders die Spermatozoendichte (nicht unter 40 Mio/ml) sowie die Motilität (Gesamtmotilität nicht unter 60%) wurden berücksichtigt.

Da angenommen wurde, daß die Behandlung der Spermatozoen vor der Trennung ausschlaggebend für den Trennerfolg ist, wurden die Ejakulate mit verschiedenen Methoden isoliert, gewaschen und gereinigt. Folgende Voraussetzungen sollten erfüllt sein:

- um die Zellmembranen der Spermatozoen unbeschädigt zu lassen, müssen starke physikalische Noxen vermieden werden
- alle Isolier- und Waschmedien sollten isoton, isoosmolar und frei von cytotoxischen Bestandteilen sein
- Agglomeration und Agglutination der Spermatozoen sind zu vermeiden
- die Spermatozoen sollten von anderen korpuskulären Bestandteilen der Ejakulate, wie Epithelzellen, Erythrocyten, Leukocyten, Bakterien, sowie mißgebildeten Spermatozoen oder Spermatozoenfragmenten die oft physiologischerweise in den Proben enthalten sind, gereinigt werden

- um die Motilität der Spermatozoen nicht zu beeinträchtigen, sollten alle Gefäße und Flüssigkeiten auf 25°C temperiert werden
- von der Ejakulation bis zur Durchführung der Trennung sollten nicht mehr als 60 min vergehen

Grundsätzlich wurden zwei verschiedene Aufbereitungsarten entwickelt und angewendet, die kurz mit (1) und (2) bezeichnet werden:

Aufbereitung (1):

Es handelt sich um eine relativ einfache Methode, bei der die Spermatozoen nur gewaschen und in Kammerpuffer überführt werden. Um den Übergang der Spermatozoen vom Seminalplasma in den Kammerpuffer schonender zu gestalten, wurden Intermedien eingeführt, die in ihrer Zusammenstellung dem Seminalplasma ähnlich sind. Folgende Intermedien wurden verwendet:

Intermedium (1)

Hanks' Salzlösung

Zusammensetzung:

8,00 g NaCl
0,40 g KCl
0,30 g NaHCO₃
0,15 g Na₂HPO₄ x 12H₂O
0,06 g KH₂PO₄
1,00 g Glucose x 1H₂O
0,02 g Phenolrot
getrennt lösen:
0,100 g MgSO₄ x 7H₂O
0,100 g MgCl₂ x 6H₂O
0,185 g CaCl₂ x 2H₂O

ad 1000 ml H₂O

mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

Intermedium (2)

Tyrode, modifiziert mit Hepes

Zusammensetzung:

8,00 g NaCl

0,20 g KCl

1,00 g NaHCO₃

3,57 g Hepes

1,01 g Glucose

getrennt lösen:

0,260 g CaCl₂ x 2H₂O

0,212 g MgCl₂ x 6H₂O

0,036 g Na- pyruvat

ad 1000 ml H₂O

mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

Osmolalität: 307 mOsmol/l

Nach einer Verflüssigungszeit von 30 min wurde das Ejakulat mit 1000 U/min (160 g) 15 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert und das überstehende Seminalplasma dekantiert. Das Pellet wurde in dem jeweiligen Intermedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Hälfte des Überstandes wurde daraufhin abgesaugt, durch Kammerpuffer ersetzt und wieder zentrifugiert. Beim Resuspendieren der gewaschenen Spermatozoen in Kammerpuffer wurde die Spermatozoendichte auf 30 bis 40 Mio/ml eingestellt.

Aufbereitung (2):

Diese kompliziertere Methode hat den Vorteil, daß die Spermatozoen zusätzlich gereinigt werden. Wie aus den Trennversuchen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation bekannt war (siehe S. 111), kann ein Percoll^R-Gradient dazu eingesetzt werden, Spermatozoen zu reinigen und nach ihrer Motilität anzureichern. Der Gradient mußte zu diesem Zweck so gewählt werden, daß die Spermatozoen zwar noch gereinigt, jedoch noch nicht nach X- und Y- Spermatozoen aufgetrennt wurden. Dies ist nur möglich, wenn die höchste Dichte des

Gradienten 1,09 g/ml nicht überschreitet. Ein Dichtegradient von 1,04 bis 1,09 g/ml reicht gerade aus, um Spermatozoenbruchstücke, Bakterien und andere Zellen abzutrennen, läßt aber die viel geringeren Dichteunterschiede von X- und Y-Spermatozoen weitgehend unberücksichtigt.

Bei dieser Methode wurde das Ejakulat 10 min bei 800 U/min (120 g) zentrifugiert, der Überstand bis auf 2 ml abgesaugt und das Sediment darin resuspendiert.

Der Gradient entstand in einem Kunststoff-Zentrifugenröhrchen mit 12 ml Fassungsmenge. Jeweils 2 ml einer 60 %igen, 40 %igen und 20 %igen isotonen Percoll^R-Lösung wurden vorsichtig aufeinander geschichtet und schließlich mit dem Ejakulat (2 ml) beladen.

Zentrifugiert wurde 30 min lang bei 1200 U/min (250 g).

Die gereinigten Spermatozoen bildeten ein Pellet, das nach Entfernung des Überstands in Kammerpuffer aufgenommen wurde. Zur gründlichen Entfernung des Percoll^Rs mußten die Spermatozoen noch zweimal in Kammerpuffer gewaschen werden.

Vor der Injektion in die Trennkammer wurde die Probe noch durch ein 40 µm Nylonnetz filtriert, um größere Spermatozoenagglomerationen abzuhalten.

3.2.2.4.3. Vorbereitung der Trennkammer

Bevor die Probe in die Trennkammer injiziert werden kann, muß sichergestellt sein, daß die Kammer samt Dichtungen, Membranen und Zu- und Ableitungen in einem ordnungsgemäßen Zustand ist.

- Reinigung der Kammer

Zur Reinigung wird der Frontdeckel der entleerten Kammer entfernt und beide Flächen vorsichtig mit einem fusselfreien Tuch abgewischt. Die beiden Elektrodenmembranen werden dazu zum Schutz vor Austrocknung in die vorgesehenen Behälter gebracht. Die Kammerdichtungen werden auf korrekten Sitz geprüft und alle Schläuche auf ihre Durchgängigkeit untersucht. Nun werden die Membranen wieder eingesetzt und der Frontdeckel angebracht.

- Beschichten der Kammer

Beschichtet wurde mit einer 3 %igen Albuminlösung, die man in die Kammer einfüllt und dort 3 Stunden einwirken läßt. Dazu werden die Fraktionierungsschläuche in die Albuminlösung eingetaucht und die Kammer bei Reverse- Stellung der Kammerpumpe gefüllt. Durch leichte Schläge an das Kammerfenster können eventuell haftende Luftblasen entfernt werden.

3.2.2.4.4. Herstellung und Wahl des Puffersystems

Bei allen Versuchen wurde folgende Pufferkombination verwendet, die auch bei den letzten Experimenten mit dem Elphor VaP 21 eingesetzt wurde.

Elektrodenpuffer:

100 mM Hepes (Sigma)

80 mM NaCl

mit NaOH auf pH 7,4 titriert

Osmolalität: 305 mOsm/kg H₂O

elektrische Leitfähigkeit: 8,8 mS/cm

Kammerpuffer:

10 mM Hepes

30 mM NaCl

250 mM Saccharose

1,0 g/l Humanserumalbumin (Sigma)

mit NaOH auf pH 7,4 titriert

Osmolalität: 312 mOsm/kg H₂O

elektrische Leitfähigkeit: 3,2 mS/cm

Beide Puffer wurden jeweils frisch hergestellt, kurz vor Gebrauch über ein Millipore- Membranfiltersystem (0,8 µm) filtriert und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast.

3.2.2.4.5. Trennexperimente

Bei der Wahl der physikalischen Trennparameter wurde auf die Erfahrungen mit dem Elphor VaP 21 zurückgegriffen.

Auch bei diesem Gerät wurden in ersten Testexperimenten alle physikalischen Trennbedingungen variiert und deren Einfluß auf das Trenngut beobachtet. Die Spermatozoen reagierten dabei entsprechend zu den Versuchen mit dem Elphor VaP 21.

Bei fast allen Trennexperimenten herrschten folgenden Bedingungen:

Spannung: $U = 280 - 320 \text{ V}$

daraus folgt bei einem Elektrodenabstand von $d = 4 \text{ cm}$:

elektrische Feldstärke = $70 - 80 \text{ V/cm}$

bei dem verwendeten Puffersystem entsprach dies der

Stromstärke: $I = 110 - 150 \text{ mA}$

Temperatur: $T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Trenndauer: $t = 50 - 100 \text{ sec}$

Insgesamt wurden 87 analytische Trennexperimente mit 77 verschiedenen Ejakulaten durchgeführt, die sich folgendermaßen aufteilen:

(N = Anzahl der Ejakulate)

Gruppe	N	Detektion	Probenaufbereitung
I	12	UV *	Aufbereitung (1), Intermedium (2)
II	15	VIS	Aufbereitung (1), Intermedium (1)
III	15	VIS	Aufbereitung (1), Intermedium (2)
IV	10	VIS	Aufbereitung (2)
V	10	VIS	Aufbereitung (1), Intermedium (2) Aufbereitung (2) **
VI	10	VIS	Aufber.(1), Intermedium (2) ***
VII	5	VIS	Aufbereitung (2) ***

- * Gerät mit UV-Detektion, da zunächst kein ACE 710 VIS zur Verfügung stand.
- ** Die Ejakulate wurden vorher in zwei Hälften gesplittet und getrennt voneinander behandelt.
- *** Bei diesen Experimenten wurden alle Medien ohne Ca^{++} -Zusätze hergestellt.

Die Anwesenheit von Ca^{++} - Ionen ist eine notwendige Voraussetzung für die Auslösung der Akrosomreaktion an den Spermatozoen (YANAGIMACHI 1978, HYNÉ 1979). Es ist nicht auszuschließen, daß auch im Rahmen der hier herrschenden Versuchsbedingungen bei einigen Spermatozoen eine Akrosomreaktion eintritt, die durch die Anwesenheit von Ca^{++} - Ionen im Waschmedium (Tyrode) noch begünstigt wird. Da die Akrosomreaktion mit einer Lyse der akrosomalen Membran und damit mit einer Oberflächenveränderung des Spermatozoenkopfes einhergeht, ist es wahrscheinlich, daß auch die Oberflächenladungen am Spermatozoenkopf betroffen werden, womit sich die Nettoladung und damit auch die elektrophoretische Mobilität der Samenzelle verändern würden.

Durch die Möglichkeit der Videodetektion, die das ACE 710 im Gegensatz zum Elphor VaP 21 bot, war es nicht mehr notwendig, den Trennerfolg durch Beobachtung des Bandenverlaufs zu beurteilen. Es wurde jediglich überprüft, ob die Kammer sauber und gasblasenfrei war und die Spermatozoenbande eine gerade Strombahn beschrieb. Die Spermatozoenverteilung in der Bande nach der Passage des elektrischen Feldes wurde durch eine Videokamera aufgezeichnet. Ein Bildschirm ermöglicht ein vergrößertes Realbild, das sich besonders zur Beurteilung der Homogenität der Bande eignet. Gleichzeitig erscheint die Spermatozoenverteilung durch Absorptionsmessung in Diagrammform auf dem Monitor.

3.2.2.4.6. Analyse der Fraktionen

Der Trennverlauf wurde auf dem Bildschirm verfolgt und das Trennprofil auf dem Plotter ausgedruckt. Wenn eine Auftrennung der Probe zu erwarten war, d.h. wenn das Trennprofil einer zweigipfligen Kurve glich, wurde eine präparative Trennung über mindestens 30 min durchgeführt.

Die einzelnen Fraktionen wurden in Kunststoffröhrchen auffangen und auf ihre Spermatozoendichte und Motilität hin untersucht (siehe 3.2.2.3.7.).

3.2.2.4.7. Identifizierung der aufgetrennten Spermatozoen

Zum Nachweis der F-body-tragenden Spermatozoen wurde die Färbemethode (2), wie in 3.2.1.6. beschrieben, verwendet.

3.2.3. Eine Migrations-Sedimentations-Technik für Spermatozoen und ihr Einfluß auf die Motilitäts- und Geschlechtsverteilung

Eine neue Methode zur Anreicherung motiler Spermatozoen unter Verzicht auf Zentrifugation oder andere physikalische Hilfsmittel wurde 1983 von TEA et al. vorgestellt.

Diese Autoren entwickelten eine Trennkammer, die sowohl die Migration (Eigenbeweglichkeit) der Spermatozoen, als auch deren gravitationsbedingte Sedimentation zur Separation der progressiv- motilen Samenzellen ausnützt.

In den folgenden Experimenten wurden Ejakulate nach dieser Methode behandelt und der Einfluß auf die Motilitätsverteilung durch die Motilitätsmessung nach Brunner analysiert. Gleichzeitig wurde untersucht, ob durch die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von X- und Y- Spermatozoen (siehe S. 10) die Geschlechtsverteilung in den einzelnen Arealen des Apparates beeinflußt wird.

3.2.3.1. Gerätebeschreibung

Abb.7 zeigt den schematischen Aufbau des von TEA et al. entwickelten (M-S-) Apparates und veranschaulicht das Prinzip.

In einem konzentrischen Glasgefäß von 65 mm Höhe und einem Durchmesser von 15 mm (A) befindet sich zweites, kleineres Glasgefäß (B), das sich nach unten hin verjüngt. Eine Zwischenwand (C) unterteilt den befüllbaren Raum in drei Bereiche:

(a) ist ein ringförmiges Areal von ca. 0,3 ml Fassungsvermögen; hier wird das Ejakulat eingebracht.

(b) und (c) werden mit Kulturmedium aufgefüllt.

3.2.3.2. Prinzip

Das Ejakulat wird durch Masturbation gewonnen, und nach einer Verflüssigungszeit von 30 min auf seine Qualität hin untersucht. Der Apparat wird nun mit ca. 1,5 ml Kulturmedium gefüllt. Anschließend werden mit einer Kanüle 0,2 ml des Ejakulats ohne weitere vorherige Behandlung in den Raum (a)

vorsichtig eingebracht. Eine Vermischung mit dem Kulturmedium ist dabei unbedingt zu vermeiden.

Die so bestückten Glasgefäße werden bei 30 °C an einem erschütterungsfreien Ort inkubiert.

Progressiv-motile Spermatozoen werden im Laufe der Zeit den Bereich (a) verlassen, in der Lage sein die Zwischenwand (C) zu überwinden, sich im Bereich (b) aufhalten und schließlich zum Teil in den Bereich (c) sedimentieren, wo sie mit einer Kanüle entnommen werden können.

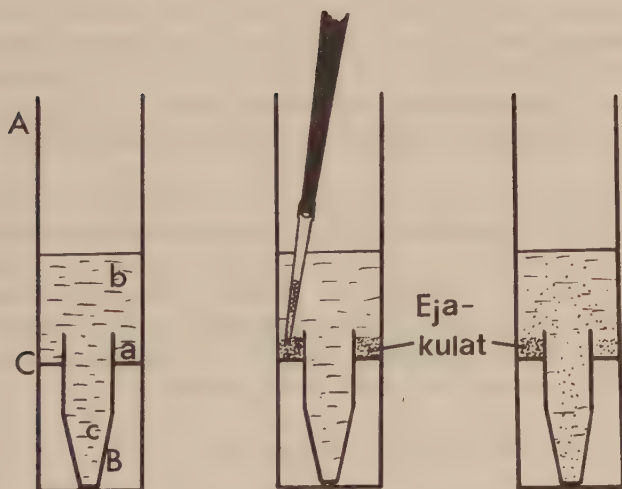


Abb.7: Migrations- Sedimentations- Technik nach TEA et al.

3.2.3.3. Durchführung der Experimente

Aus der Andrologischen Ambulanz der Dermatologischen Universitätsklinik München wurden 5 Ejakulate von Patienten und Spendern durch Masturbation gewonnen und untersucht (siehe S. 5).

Die Spermatozoendichte in den einzelnen Ejakulaten rangierte zwischen 62 Mio/ml und 115 Mio/ml.

Während der ganzen Dauer des Experiments wurde die Umgebungstemperatur der Spermatozoen konstant auf 30 °C gehalten.

Jeweils 0,2 ml eines verflüssigten Ejakulats wurden in einen Migrations-Sedimentations-Apparat eingebracht. Als Kulturmedium diente die aus den vorherigen Experimenten schon bekannte modifizierte Tyrode mit Hepes.

Probengewinnung für die Motilitätsmessungen:

Nach jeweils 30 min, 1 h, 2 h, 3 h und 6 h wurde aus dem konischen Glasröhrchen (c) eine Probe von 10 ul entnommen um sie der Motilitätsmessung zu unterziehen. Als Vergleich diente eine Messung der Probe vor dem Einbringen in die M-S-Kammer.

Probengewinnung für die Bestimmung der Geschlechtsverteilung:

Parallel dazu wurden bereits nach 10 min, 20 min, 30 min, 45 min und 60 min jeweils eine Probe von 20 ul aus dem Überstand (Bereich (b)) und dem Glasröhrchen (c) abpipettiert. Sie dienten zur Herstellung von Ausstrichpräparaten.

3.2.3.4. Analyse der Spermatozoenproben

3.2.3.4.1. Motilitätsmessungen mit dem Mikroprozessor-Bildanalyse-System AT-CAS 188

Von der Spermatozoenprobe, die sich in einer Zählkammer in der Art eines Häemocytometers befindet, wird durch eine elektronische, am Mikroskop angekoppelte Videokamera alle 40 us ein Bild erstellt und in einen Bildanalyse-Prozessor einge-

speichert. In diesem Computer werden die Bilder (es handelt sich um 8 Bilder pro Messung) in 256x256 Bildpunkte digitalisiert und gelesen. Damit die Spermatozoen vom Computer auch als Zählobjekte erkannt werden, wird das digitalisierte Bild mit Hilfe eigener Informationen des Bildanalyse-Prozessors auf charakteristische Strukturen abgesucht. Diese Informationen werden als Parameter vom Anwender einge-speichert und dienen dem Rechner als Anhaltspunkte über Fläche, Durchmesser und Radius der zu messenden Objekte. Sind alle "interessanten" Objekte (in diesem Fall die Sperma-tozoenköpfe) gefunden und nach ihren Koordinaten gespeichert, ermittelt der Computer durch Vergleich der 8 Bilder die von den Spermatozoen in der Zwischenzeit zurückgelegten Wege und berechnet daraus Motilitätsanteil, Geschwindigkeitsverteilung und Bewegungsmuster der Samenzellen.

Insgesamt wurden für jede Probe 4 Messungen durchgeführt, aus denen der Computer selbstständig die Mittelwerte errechnete.

3.2.3.4.2. X- Y- Identifizierung der Spermatozoen

Die Differenzierung von X- bzw. Y- Spermatozoen an den luft-getrockneten Ausstrichpräparaten erfolgte nach der Färbemethode (2), die in 3.2.1.6. (siehe S. 26) bereits beschrieben wurde.

Es wurden jeweils 100 Spermatozoen ausgezählt und daraus der prozentuale Anteil an F-body's ermittelt.

4.1. Dichtegradientenzentrifugation von menschlichen Spermatozoen

4.1.1. Vorversuche

zu Vorversuch A:

Bestimmung der optimalen Zentrifugationsgeschwindigkeit w und ihr Einfluß auf die Motilität bei einer konstanten Zentrifugationsdauer von $T = 30$ min.

Die Auszählung der Spermatozoen im Häemocytometer ergab für die einzelnen Fraktionen folgende Werte (prozentual zur Gesamtspermatozoenmenge):

Tab.1: Spermatozoenverteilung

Versuch (Nr:)	w (U/min)	Anteil der Spermatozoen (in %) in den Fraktionen:							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	500	23	25	31	21	-	-	-	-
2	500	18	30	25	19	8	-	-	-
3	1000	8	17	12	15	16	17	10	5
4	1000	5	6	9	16	21	15	16	12
5	1500	3	9	8	15	12	16	20	17
6	1500	-	4	17	11	18	14	14	22
7	2000	1	5	12	14	12	16	19	21
8	2000	-	7	16	17	12	14	13	21
9	2500	2	4	10	20	15	13	22	14
10	2500	-	10	10	18	14	18	12	18

Daneben wurde auch der Anteil der motilen (progressiv + ortsbeweglichen) Spermatozoen in den einzelnen Fraktionen ermittelt und in folgender Tabelle dargestellt:

Tab.2:

Vers. (Nr.)	w (U/min)	M _{ges} * (in %)	Anteil der motilen Spermien (in %) / Spermatozoen in den Fraktionen:							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	500	60	51	54	62	68	-	-	-	-
2	500	65	42	50	63	68	72	-	-	-
3	1000	60	14	20	19	29	44	48	59	66
4	1000	60	12	17	23	19	32	55	50	65
5	1500	50	-	5	12	12	28	30	49	54
6	1500	55	-	9	11	22	28	33	50	57
7	2000	60	-	4	20	18	23	33	47	59
8	2000	55	-	2	9	21	25	21	33	47
9	2500	45	-	2	2	9	12	13	23	26
10	2500	50	-	-	5	9	5	20	22	32

* M_{ges} bezeichnet die Gesamtmotilität (progressiv + ortsbeweglich) der Spermatozoen vor Durchführung der Experimente, die von geübtem Laborpersonal durch Schätzung ermittelt wurde.

Ergebnisse:

- 500 U/min reichen für die Spermatozoen nicht aus, um ihr Dichteniveau zu erreichen.
- Bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit im Bereich von 1000 bis 1500 U/min (160 bis 350 g) ist der Sedimentationsvorgang der Samenzellen abgeschlossen, d.h. eine höhere Geschwindigkeit beeinflusst die Verteilung der Spermatozoen im Gradienten nicht mehr.
- Der Anteil der motilen Spermatozoen steigt mit der Dichte der Gradientenstufen und ist in der jeweils letzten Fraktion am größten. Bei den Versuchen 1 bis 6 übersteigt die Gesamtmotilität in den letzten Fraktionen sogar die Ausgangswerte M_{ges}.
- Beträgt die Zentrifugationsgeschwindigkeit 2000 U/min (630 g) und mehr, bedeutet dies einen Rückgang der verblei-

benden Motilität in den Fraktionen. Dies steht im Gegensatz zu den Experimenten von JEULIN et al. (1982), die selbst bei einer Zentrifugationsbeschleunigung von 2500 g keine signifikante Verminderung der Motilität erkennen konnten.

Schlußfolgerung:

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die optimale Zentrifugationsgeschwindigkeit zwischen 1000 und 1500 U/min (160 bis 350 g).

zu Vorversuch B:

Bestimmung der optimalen Zentrifugationsdauer T und ihr Einfluß auf die Motilität bei einer konstanten Zentrifugationsgeschwindigkeit von $w = 1200$ U/min (250 g)

Die Auszählung der Spermatozoen im Hämocytometer ergab für die einzelnen Fraktionen folgende Werte (prozentual zur Gesamtspermatozoenmenge):

Tab.3: Spermatozoenverteilung:

Versuch (Nr:)	T (min)	Anteil der Spermatozoen (in %) in den Fraktionen:							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	10	29	33	27	7	4	-	-	-
2	10	24	37	19	9	6	5	-	-
3	20	22	13	14	13	16	12	7	3
4	20	15	13	23	21	20	8	-	-
5	30	12	12	18	15	18	16	5	4
6	30	21	11	11	12	10	15	15	5
7	40	5	9	14	12	18	17	10	15
8	40	3	7	12	12	15	19	15	17
9	50	1	6	9	13	14	18	19	20
10	50	2	3	8	9	13	17	22	26

Der Anteil der motilen Spermatozoen in den 8 Fraktionen ist in folgender Tabelle dargestellt:

Tab.4: Anteil der motilen Spermatozoen:

Vers. (Nr.)	T (min)	M _{ges} (in %)	Anteil der motilen Spermien (in %) / Spermatozoenzahl in den Fraktionen:							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1	10	50	11	9	15	17	19	-	-	-*
2	10	40	9	14	11	30	33	42	-	-
3	20	65	8	12	23	42	40	45	42	56
4	20	60	2	9	11	29	60	66	-	-
5	30	45	2	4	9	23	22	28	30	47
6	30	55	4	4	7	18	24	31	53	55
7	40	60	-	9	19	21	25	29	46	75
8	40	60	-	-	3	12	23	38	42	79
9	50	40	-	-	5	8	5	42	55	82
10	50	50	-	-	-	5	7	32	58	89

* das schnelle Absinken der Gesamtmotilität bei diesem Versuch ist wahrscheinlich auf individuelle, unter Umständen pathologische Eigenschaften des Ejakulats zurückzuführen.

Ergebnisse:

- Bei einer Zentrifugationsdauer von T = 40 min sind die Spermatozoen wieder gleichmäßig auf den Gradienten verteilt.
- Eine längere Dauer (T = 50 min) dagegen bringt eine weitere Konzentrierung der Spermatozoen auf die letzten drei Fraktionen. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Versuch A, da eine Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit über $w = 1500$ U/min denselben Effekt hätte haben müssen.
- Betrachtet man die Motilitätswerte bei den Versuchen 9 und 10, so kann man eine signifikante Erhöhung der Gesamtmotilität in den letzten Fraktionen feststellen.

Schlußfolgerungen:

- Bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von $w = 1200$ U/min (250 g), ist der Sedimentationsvorgang nach spätestens 40 min abgeschlossen. Die optimale Zentrifugationsdauer beträgt für die zugrundeliegende Versuchsanordnung also 40 min.
- Die zusätzliche Verschiebung der Spermatozoenverteilung bei einer längeren Zentrifugationsdauer ($T = 50$ min) resultiert vermutlich aus einer Einwanderung progressiv beweglicher Spermatozoen in die dichteren Gradientenstufen. Die starken Motilitäts erhöhungen in den letzten Fraktionen deuten darauf hin.

4.1.2. Trennversuche (zu: 3.2.1.7.)

Damit alle Versuchsansätze einer Gruppe gemeinsam ausgewertet werden können, ist es erforderlich, die gemessenen Werte in miteinander vergleichbare Resultate umzuwandeln.

Die Spermatozoenverteilung im Gradienten wird ausgedrückt als prozentualer Anteil der Spermatozoen pro Fraktion im Verhältnis zur Gesamtmenge der Samenzellen im Gradienten.

Die Restmotilität der Samenzellen in den einzelnen Fraktionen wird in Relation zur Ausgangsmotilität des jeweiligen Ejakulates gesetzt und in Prozent angegeben.

Der Anteil der F-body tragenden Spermatozoen wird ebenfalls in Prozent angegeben.

Gruppe (1): (= ohne HSA)

Tab.5 stellt alle wichtigen Resultate als Mittelwerte ($\bar{x}$) aus den 20 Versuchsansätzen dar. Daneben sind die zugehörigen Standardabweichungen (σ) aufgelistet. Bei den Ergebnissen der Motilitätsmessungen können $\%$ -Werte über 100 auftreten, da die Ausgangsmotilität als Vergleichswert kein absolutes Ganzes darstellt.

Gruppe (2): (= mit Zusatz von HSA)

Die Ergebnisse aus den 10 Versuchsansätzen wurden wie in Gruppe (1) ausgewertet und sind in Tab.6 zusammengefaßt.

Tab. 5.

Ergebnisse aus den Experimenten zur Dichtegradientenzentrifugation, ausgedrückt in Mittelwerten ($\bar{x}$) und den dazugehörigen Standardabweichungen (σ):

Gruppe (1): n = 20 (ohne HSA)

Frakt. (Nr.)	Dichte (g/ml)	% Anteil der Spermatozoen: *		% Anteil der Restmotilität ** progressiv:		ortsbeweglich:		% Anteil der F-body's:	
		$\bar{x}_N / \text{sperm}$	σ_N / sperm	$\bar{x}_M / \text{prog}$	σ_M / prog	$\bar{x}_M / \text{ort}$	σ_M / ort	$\bar{x}_F / \text{body}$	σ_F / body
1	1,04	7,05	4,21	4,15	3,69	11,80	8,36	62,10	7,48
2	1,06	10,90	3,88	8,90	7,06	27,15	17,97	55,05	3,68
3	1,07	14,60	4,39	32,10	13,21	65,20	16,73	48,45	5,67
4	1,08	15,05	4,42	41,95	13,16	83,65	18,21	38,45	3,38
5	1,09	16,00	5,79	57,00	16,47	94,20	9,73	34,95	3,62
6	1,10	13,50	3,75	74,10	19,06	104,90	16,20	30,15	4,07
7	1,11	11,30	2,94	87,15	21,67	110,30	22,16	21,65	7,04
8	1,12	11,60	5,21	110,65	14,91	126,65	18,55	19,85	5,55

* N/sperm ist der prozentuale Anteil der Spermatozoen, bezogen auf die Gesamt-spermatozoenzahl im Gradienten.

** M/prog bzw. M/ort ist die progressive bzw. ortsständige Motilität der getrennten Spermatozoen im Verhältnis zur progressiven bzw ortsständigen Ausgangsmotilität im Ejakulat

Tab. 6.

Ergebnisse aus den Experimenten zur Dichtegradientenzentrifugation, ausgedrückt in Mittelwerten ($\bar{x}$) und den dazugehörigen Standardabweichungen (σ):

Gruppe (2): $n = 10$ (mit HSA)

Frakt. (Nr.)	Dichte (g/ml)	%Anteil der Spermatozoen:*		%Anteil der Restmotilität** progressiv:		ortsbeweglich:		%Anteil der F-bodys:	
		XN/sperm	ON/sperm	XN/prog	ON/prog	XN/ort	ON/ort	XP-body	OP-body
1	1,04	2,50	1,72	4,40	4,62	12,60	8,34	63,10	3,18
2	1,06	9,00	2,00	7,80	4,85	24,80	18,26	54,40	2,59
3	1,07	13,00	2,26	33,00	10,20	69,40	16,25	48,10	2,23
4	1,08	14,20	2,57	38,30	10,27	80,80	16,45	40,10	2,77
5	1,09	15,30	3,89	52,60	15,09	91,90	10,49	31,80	1,87
6	1,10	14,10	2,85	75,90	20,55	108,30	18,10	26,80	2,57
7	1,11	15,40	2,32	88,80	19,65	116,10	23,41	24,10	1,37
8	1,12	16,50	3,10	107,90	5,36	127,30	18,39	20,10	2,73

* N/sperm ist der prozentuale Anteil der Spermatozoen, bezogen auf die Gesamt-spermatozoenzahl im Gradienten.

** M/prog bzw. M/ort ist die progressive bzw. ortständige Motilität der getrennten Spermatozoen im Verhältnis zur progressiven bzw ortständigen Ausgangsmotilität im Ejakulat

Ergebnisse:

- Die Spermatozoen verteilten sich gleichmäßig in dem Gradienten. Tab.5 zeigt eine geringe Bevorzugung der Fraktionen 3 bis einschl. 6 in Gruppe (1).

Die Spermatozoenverteilung ist in Abb.8 grafisch dargestellt.

- Fraktion 1 und in geringerer Weise auch Fraktion 2 waren bei allen Experimenten stark verunreinigt durch Rundzellen, Bakterien und Bruchstücke von Epithelzellen.
- Die morphologische Begutachtung der Spermatozoen im Phasenkontrastmikroskop ergab eine Häufung der defekten Zellen in der ersten Fraktion, Fraktion 2 enthielt deutlich weniger abnorme Samenzellen. In den folgenden Fraktionen waren nur noch lichtmikroskopisch normale Zellen zu finden. Auch Spermatozoenbruchstücke, wie Schwanzteile und einzelne Köpfe konnten nur in den ersten beiden Fraktionen beobachtet werden.
- Die progressive Motilität steigt deutlich mit der Zunahme der Dichte und erreicht in Fraktion 8 sogar Werte, welche die Ausgangsmotilität übersteigen.
Abb.9 veranschaulicht diesen Verlauf.
- Beim Anteil der ortsbeweglichen Spermatozoen ist der Anstieg der Motilität noch signifikanter. Bereits in der 6. Fraktion werden die Ausgangswerte für die Ortsbeweglichkeit überschritten (Abb.10).
- Der Anteil der Spermatozoen mit F-bodys verhält sich umgekehrt proportional zur Dichte in den Fraktionen. Wenn man den durchschnittlichen Anteil an F-bodys in den Ejakulaten von 45% (siehe S. 13) mit den Resultaten aus Tab.5 und 6 vergleicht, erkennt man eine Verschiebung zugunsten der F-body-tragenden Spermatozoen um 17 bzw. 18 Prozentpunkte in (der leichten) Fraktion 1 und demgegenüber eine Abnahme der F-bodys um 25 Prozentpunkte in (der schweren) Fraktion 8.
Abb.11 zeigt diesen Verlauf grafisch.
- Die Ergebnisse aus den Gruppen (1) und (2) unterscheiden sich nicht signifikant, eine Verbesserung der Resultate durch den Zusatz von Albumin ist dadurch nicht bewiesen.

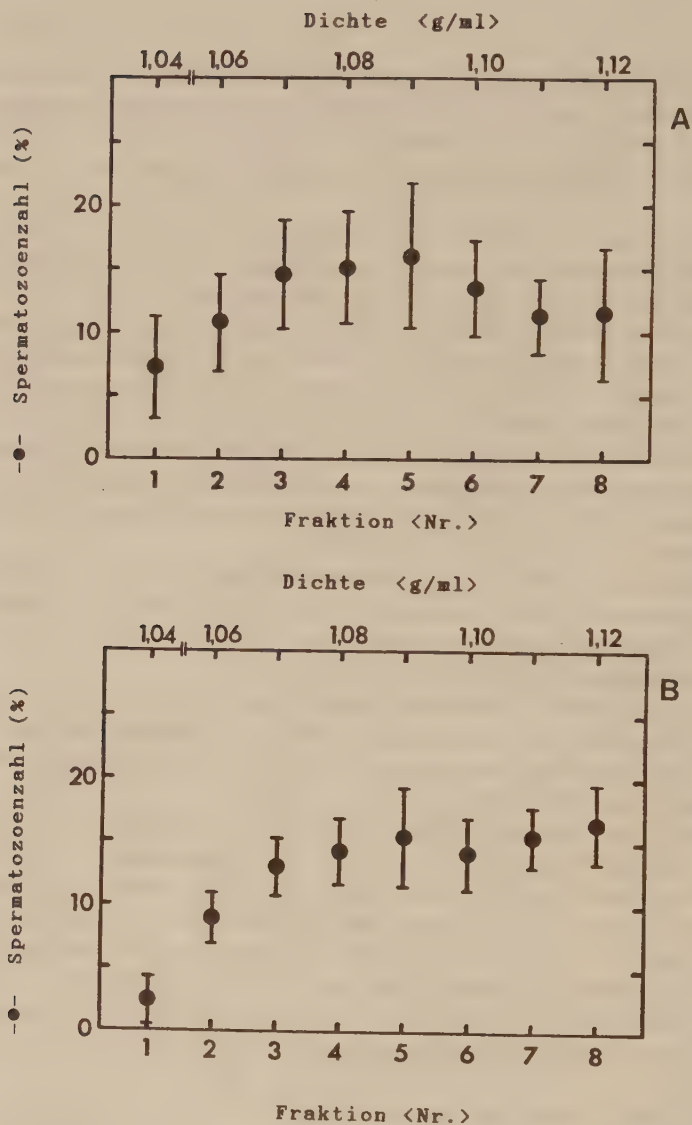


Abb.8: Spermatozoenverteilung im Gradienten
A: Gruppe (1), B: Gruppe (2)

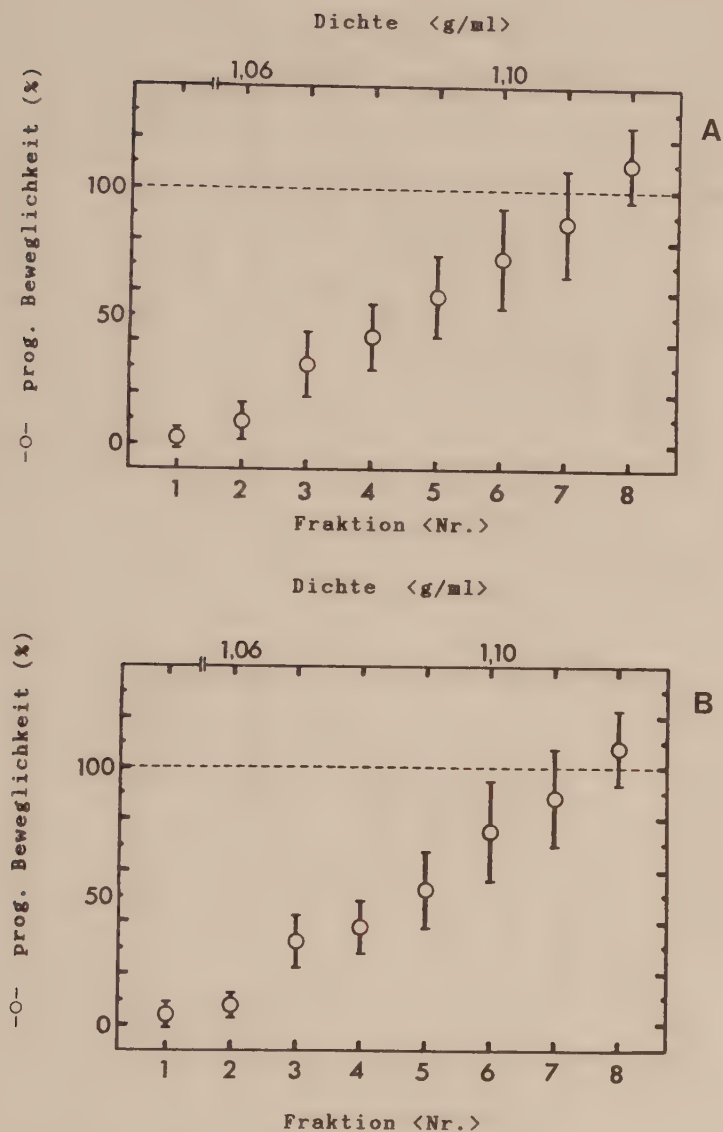


Abb.9: progressive Motilität in Relation zur Ausgangsmotilität; A: Gruppe (1), B: Gruppe (2)

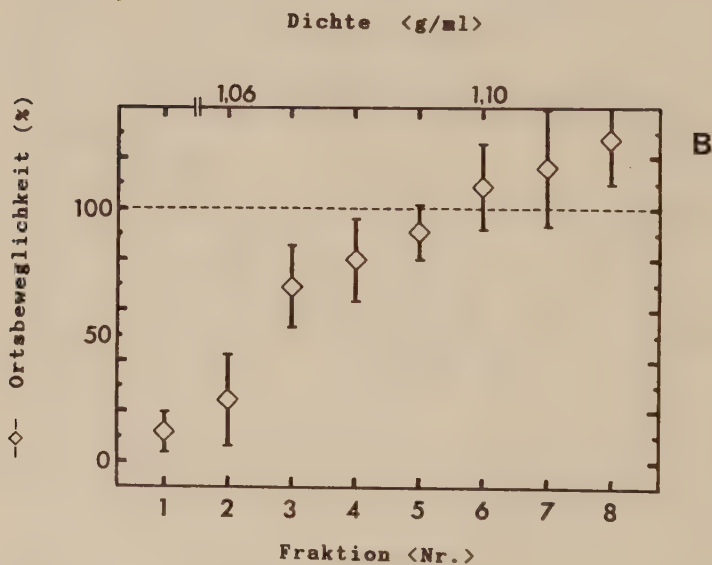
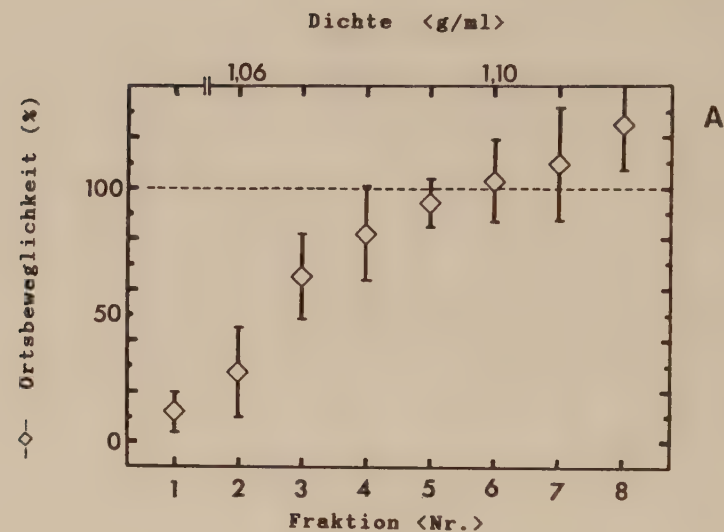


Abb.10: ortsständige Motilität in Relation zur Ausgangsmotilität; A: Gruppe (1), B: Gruppe (2)

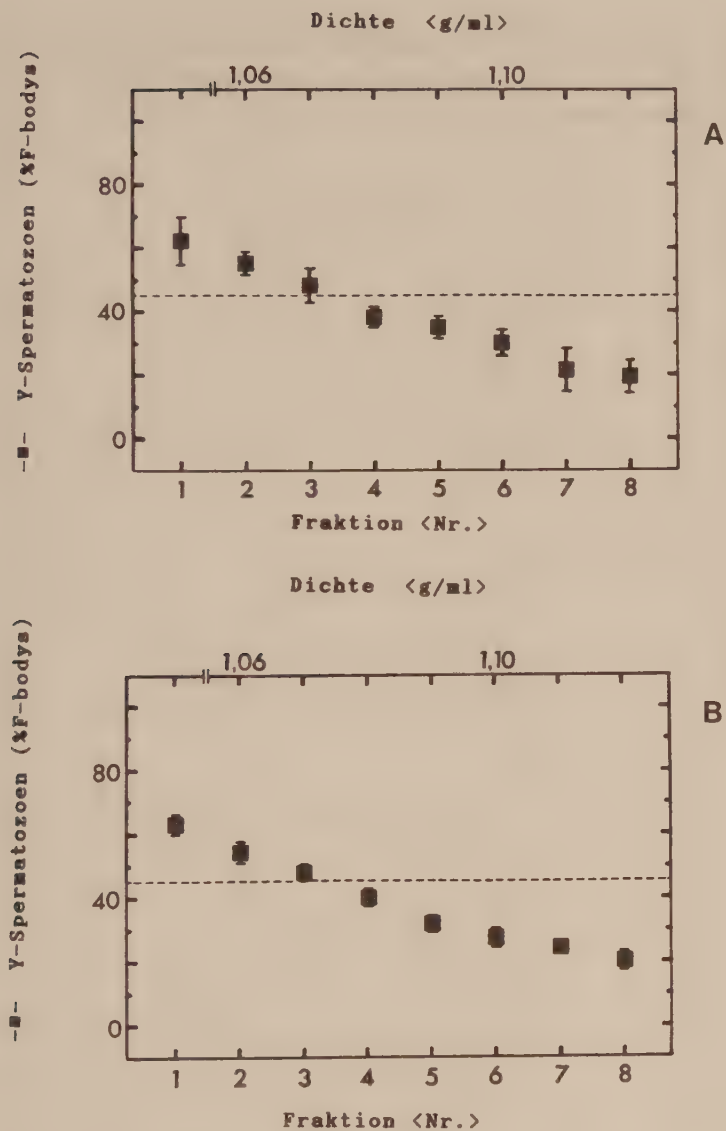


Abb.11: prozentualer Anteil der F-bodys

A: Gruppe (1), B: Gruppe (2)

Gruppe (3): (Experimente mit "sanftem" Gradienten)

Auch die Resultate aus den 10 Einzelexperimenten der Gruppe (3) wurden jeweils in einem Mittelwert zusammengefaßt und in Tab.7 zusammengestellt.

Tab.7.

Ergebnisse aus den Experimenten zur Dichtegradientenzentrifugation, ausgedrückt in Mittelwerten ($\bar{x}$) und den dazugehörigen Standardabweichungen (σ):

Gruppe (3): $n = 10$ (Experimente mit "sanftem" Gradienten)

Frakt. (Nr.)	Dichte (g/ml)	% - Anteil der Spermatozoen: *		% - Anteil der Restmotilität **			% - Anteil der F - bodys:	
		XN/sperm	ON/sperm	XN/prog	OM/prog	XM/ort	OM/ort	OF-body
1	1,04	2,60	1,71	4,30	3,13	10,60	6,87	58,10
2	1,05	1,60	1,35	9,50	5,33	26,80	14,91	51,80
3	1,06	4,90	2,23	20,20	10,55	30,50	12,05	50,10
4	1,07	6,00	2,71	31,20	14,25	59,60	15,90	46,00
5	1,08	4,20	1,55	50,60	15,75	78,90	16,23	45,80
6	1,09	3,40	2,01	93,00	22,56	90,00	14,98	46,20
7	1,09	9,90	3,28	119,90	20,77	128,60	17,20	42,40
H	1,09	67,70	5,01	132,10	18,18	169,20	13,99	43,00

* N/sperm ist der prozentuale Anteil der Spermatozoen, bezogen auf die Gesamt-spermatozoenzahl im Gradienten.

** M/prog bzw. M/ort ist die progressive bzw. ortsständige Motilität der getrennten Spermatozoen im Verhältnis zur progressiven bzw ortsständigen Ausgangsmotilität im Ejakulat

Ergebnisse:

- Schon makroskopisch konnte man nach dem Zentrifugieren einen Bodensatz erkennen. Wie aus Tab.7 klar ersichtlich, ergab die Auszählung der Samenzellen eine deutliche Anreicherung in der letzten Fraktion.
- Abb.12 zeigt die prozentuale Spermatozoenverteilung in den einzelnen Fraktionen grafisch.
- Wie schon bei den Experimenten aus den Gruppen (1) und (2) waren nur in den ersten beiden Fraktionen Verunreinigungen durch Rundzellen (Spermatiden, Lymphozyten), Bakterien oder Spermatozoenbruchstücke festzustellen.
- Die Fraktionen 5 bis 8 enthielten ausschließlich morphologisch normale Spermatozoen.

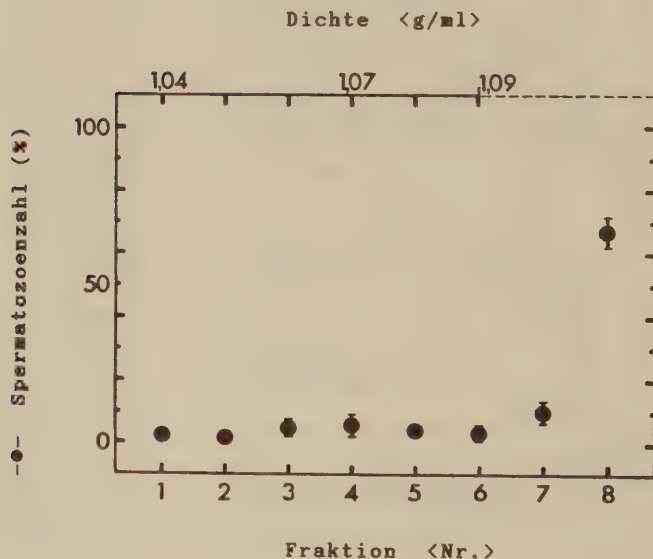


Abb.12: Spermatozoenverteilung im Gradienten; Gruppe (3)

- Auch die progressive Beweglichkeit nimmt wieder mit dem Anstieg der Dichte zu. In Fraktion 7 nahm die Zahl der progressiv beweglichen Spermatozoen im Vergleich zu den Ausgangswerten im Mittel um 20 Prozent zu, in Fraktion 8 handelte es sich sogar um eine Verbesserung von durchschnittlich 33 Prozentpunkten.

Abb.13 veranschaulicht diesen Verlauf optisch. Die gestrichelte Linie (bei 100 %) verdeutlicht die Relation zu den jeweiligen Ausgangswerten.

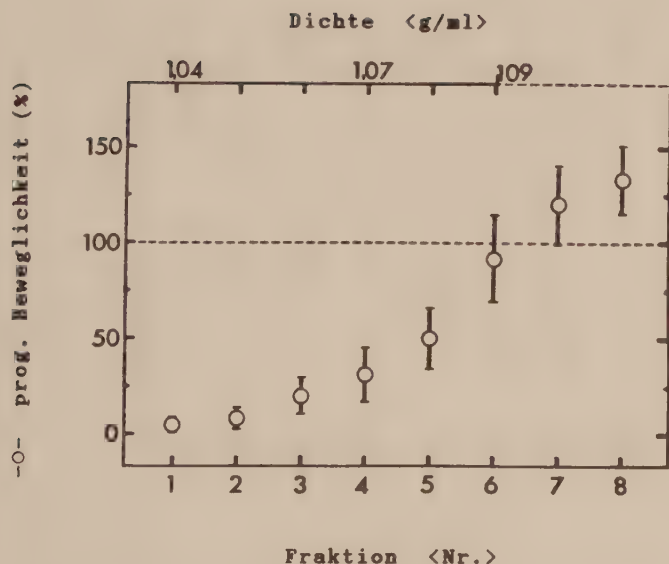


Abb.13: progressive Motilität in Relation zu den Ausgangswerten; Gruppe (3)

- Der Anteil der ortsbeweglichen Spermatozoen steigt ebenfalls wieder in Richtung der "schwereren Fraktionen" an und erreicht in den beiden letzten Fraktionen wesentliche Verbesserungen im Vergleich zu den Ausgangswerten. Tab.7 zeigt eine Erhöhung um nahezu 70 Prozent in der letzten Fraktion.

In Abb.14 ist dieser Verlauf mit seinen statistischen Streuungen grafisch dargestellt.

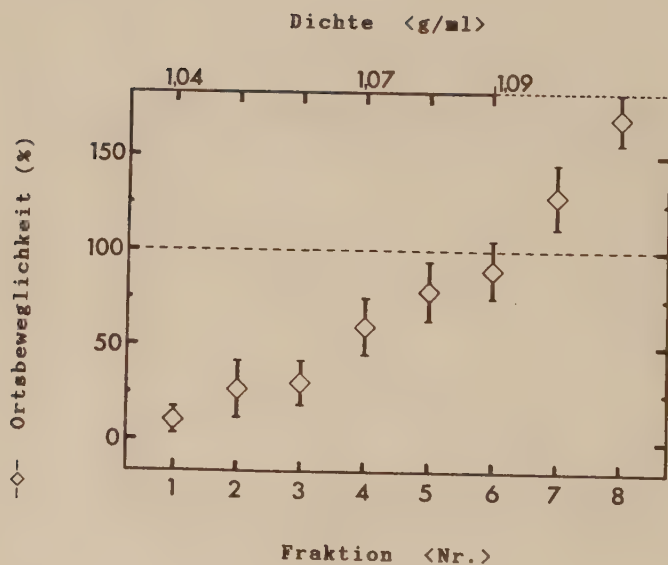


Abb.14: ortsständige Motilität in Relation zu den Ausgangswerten; Gruppe (3)

- Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung auf F-body ergab im Vergleich zu den Resultaten der ersten beiden Gruppen völlig andere Ergebnisse. Zwar ist noch eine abfallende Tendenz in Richtung der "schwereren Fraktionen" zu erkennen, die mittlere Abweichung zum Normalwert (von 45 Prozent beträgt jedoch im Höchstfall nur 13 Prozentpunkte in Richtung der F-body-tragenden Samenzellen (Fraktion 1) sowie knapp 3 Prozentpunkte in Richtung der ungefärbten Spermatozoen (Fraktion 7). Die Resultate sind in Abb.15 bildlich dargestellt. Der Normalwert von 45 % ist durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben.

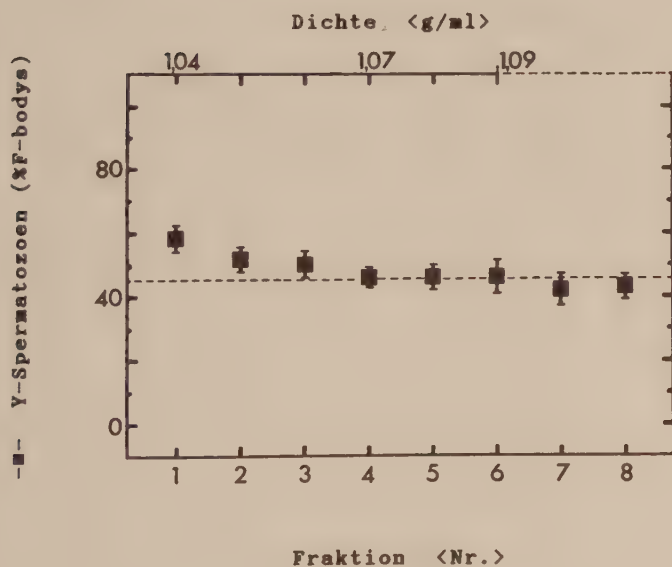


Abb.15: prozentualer Anteil der F-bodys; Gruppe (3)

4.2. Die elektrophoretische Trennung von menschlichen X- und Y- Spermatozoen

4.2.1. Elphor Vap 21

4.2.1.1. Vorversuche

zu Vorversuch A:

Der Einfluß verschiedener osmotischer Expander auf die Motilitätsrate:

Ejakulat (1):

Ausgangsmotilität: progressiv: 30 %
ortsbeweglich: 25 %

Expander	Motilität nach 2 h		Motilität nach 4 h	
	progr.:	ortsbew.:	progr.:	ortsbew.:
Glycin	10 %	15 %	5 %	15 %
Glucose	20 %	25 %	10 %	30 %
Fructose	15 %	30 %	5 %	35 %
Saccharose	20 %	25 %	10 %	25 %

Ejakulat (2):

Ausgangsmotilität: progressiv: 25 %
ortsbeweglich: 25 %

Expander	Motilität nach 2 h		Motilität nach 4 h	
	progr.:	ortsbew.:	progr.:	ortsbew.:
Glycin	10 %	15 %	2 %	10 %
Glucose	15 %	20 %	5 %	20 %
Fructose	10 %	25 %	5 %	20 %
Saccharose	15 %	20 %	5 %	20 %

Ergebnisse:

- Bei allen Versuchsansätzen ist eine Abnahme der Motilitätsrate (vor allem zu ungunsten der progressiven Beweglichkeit) entsprechend der Inkubationsdauer zu erkennen.
- Glycin zeigt bei beiden Ejakulaten eine deutlich stärkere Hemmung von progressiver und ortsbeweglicher Motilität als die drei Zucker.
- Die 2-Stunden-Werte mit Fructose lassen eine geringe Verschiebung der Motilitätsrate zugunsten der ortsbeweglichen Spermatozoen erkennen.
- Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Spermatozoen war zu erkennen, daß die Geschwindigkeit der progressiv motilen Spermatozoen in Fructose überdurchschnittlich hoch, in Glucose dagegen stark verlangsamt war.

Schlußfolgerungen:

- Glycin ist als Expander für Spermatozoenmedien nicht geeignet, da es einen besonders negativen Einfluß auf die Motilitätsrate ausübt.
- Glucose hemmt die Motilitätsrate der Spermatozoen in geringerem Maße, verlangsamt aber deren Bewegungen.
- Fructose hat ebenfalls geringeren Einfluß auf die Motilitätsrate, beschleunigt sogar die Geschwindigkeit der Bewegungen, bewirkt aber dadurch vermutlich eine schnellere Erschöpfung der Spermatozoen und damit der progressiven Beweglichkeit.
- Saccharose scheint den Resultaten zufolge den geringsten Einfluß auf die Motilität von Spermatozoen auszuüben.

zu Vorversuch B:

Puffersysteme und ihr Verhalten im elektrischen Feld:

Nachdem für alle drei Puffersysteme der pH-Wert und die elektrische Leitfähigkeit in den 90 Fraktionen gemessen wurde, erfolgte die grafische Darstellung der Resultate in Diagrammen (siehe Abb.16):

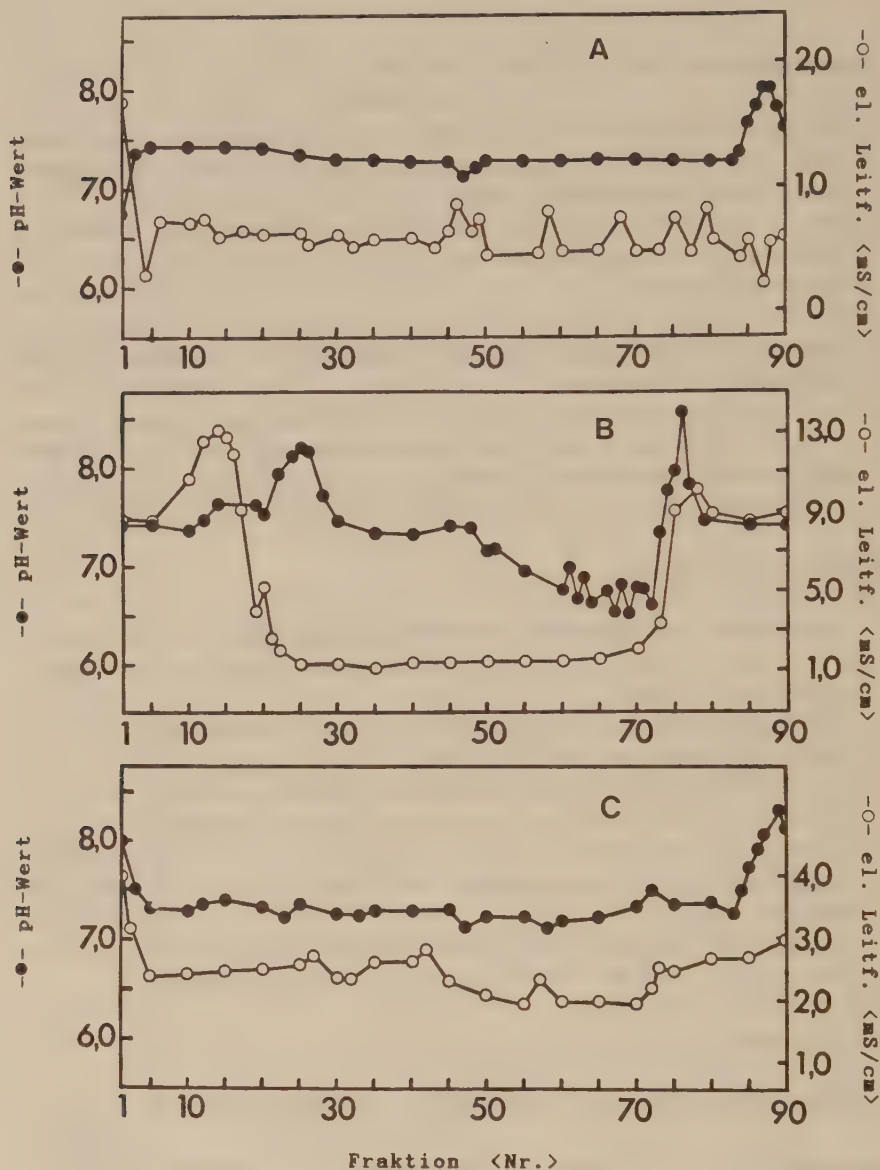


Abb.16: Trennkammerprofil von pH-Wert und el. Leifähigkeit, A: Puffersystem (1), B: Puffersystem (2); C: Puffersystem (3)

Ergebnisse:

- Das Diagramm von Puffersystem (1) zeigt deutlich ein kontinuierlich konstantes pH-Profil um 7,4 im Bereich der Fraktionen 5 bis 80. Auch die elektrische Leitfähigkeit weist nur geringe Schwankungen zwischen 0,5 und 1,0 mS/cm auf.
- Bei Einsatz von Puffersystem (1) fällt eine starke Inhomogenität des pH-Profils auf. In manchen Kammerbereichen herrschen unphysiologische pH-Werte bis 8,7. Die elektrische Leitfähigkeit weist zwei hohe Peaks in Elektrodennähe auf, während der mittlere Kammerbereich bis auf 10 % der ursprünglichen Ionenstärke verarmt ist.
- Puffersystem (3) dagegen zeichnet sich wieder durch ein ausgeglicheneres elektrochemisches Verhalten aus. Elektrische Leitfähigkeit und pH-Werte halten sich beinahe über die ganze Kammerbreite konstant.

Schlussfolgerungen:

- Die Puffersysteme (1) und (3) zeigen ein günstiges elektrochemisches Verhalten und sind daher als Trennpuffer für die Elektrophorese sehr geeignet. Ein Nachteil ist die geringe Ionenstärke, besonders bei Puffersystem (1), welche sich ungünstig auf die Lebensfähigkeit und damit auf die Motilität der Spermatozoen auswirken kann.
- Puffersystem (2) dagegen hat zwar eine höhere Ionenstärke, jedoch auch eine starke Tendenz zur Dissoziation, d.h. durch isotachophoretische Vorgänge wandern die Ionen gemäß ihrem Ladungsvorzeichen zur Kathode bzw. Anode ab und hinterlassen einen an Ionen verarmten Bereich. Inwieweit diese Unregelmäßigkeiten einen negativen Einfluß auf die Trenneffektivität haben wird, muß erst durch Trennversuche mit Spermatozoen ermittelt werden.

4.2.1.2. Trennexperimente (zu: 3.2.2.3.6.)

4.2.1.2.1. Störfaktoren

Von den insgesamt 31 Trennläufen, die durchgeführt wurden, mußten 7 Läufe vor der präparativen Trennung abgebrochen werden. Die Gründe, meist technischer Natur, werden in der folgenden Aufstellung - in der Reihenfolge der abnehmenden Häufigkeit - angegeben:

- Turbulenzen in der Trennkammer als Folge eines Lecks, meist verursacht durch defekte (eingerissene oder verschmorte) Membranen bzw. insuffiziente Dichtungen.
- Übermäßig starke Aggregatbildung bei den Spermatozoen auf dem Weg durch die Kammer. Mögliche Ursachen sind Agglomerationen oder Agglutinationen durch Autoantikörper auf den Spermatozoen (genauerer siehe Diskussionsteil) oder individuell verminderte Widerstandsfähigkeit des Ejakulats.
- Störung des Trennverlaufs durch Gasblasenbildung in der Kammer, vermutlich verursacht durch unzureichend entgaste Puffer im Einsatz bei höheren Temperaturen.
- Automatischer Abbruch durch Kurzschluß im Gerät, Ursache meist unbekannt.

Bei den übrigen 24 Experimenten wurde eine präparative Trennung durchgeführt, d.h. der Pufferstrom wurde auffraktioniert und analysiert.

4.2.1.2.2. Der Einfluß einzelner Parameter auf die Trennung

Wie auf S. 39-40 ausführlich beschrieben, wurden die technischen und chemischen Versuchsbedingungen mehrfach variiert um ihren Einfluß auf den Trennvorgang zu charakterisieren. Als Anhaltspunkt für den Effekt eines Parameters diene zunächst die visuelle Beobachtung und Beurteilung der Trennung

durch den Experimentator während der Kammerpassage. Die eigentliche Kontrolle des Trenneffekts war natürlich erst nach Analyse der einzelnen Fraktionen möglich.

Es stellte sich heraus, daß die Beurteilung der Bande in der Kammer und insbesondere der Homogenität des Trennmateri- als Ausdruck für eine starke Aggregationsbildung unter den Samenzellen.

- der Einfluß des elektrischen Feldes

Die beiden wichtigsten Kriterien waren die Verbreiterung der Bande bei der Passage des elektrischen Feldes, verursacht durch die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der Spermatozoen, sowie die Flockenbildung in der Spermatozoen- bande als Ausdruck für eine starke Aggregationsbildung unter den Samenzellen.

Der erste Effekt, die Auftrennung der Bande, ist erwünscht und sollte idealerweise zu einer Aufspaltung in zwei getrennte Banden führen. Eine sichtbare Trennung in zwei solche Banden während des Kammerdurchflusses konnte jedoch nie mit Sicherheit beobachtet werden. Erst die Auszählung der Spermatozoen in den einzelnen Fraktionen nach der präparativen Trennung, gab Aufschluß über die zahlenmäßige Verteilung innerhalb der Bande, dem sogenannten Trennprofil. Die Verbreiterung der Bande als Resultat der elektrischen Kräfte auf die Samenzellen war jedoch immer erkennbar und konnte durch gezielte Änderung der Parameter verstärkt werden. Entscheidend dafür ist die Zeitdauer, der die Spermatozoen dem elektrischen Feld ausgesetzt sind, sowie die Stärke des elektrischen Feldes.

Die Verweildauer ist das Resultat der Pufferdurchflußgeschwindigkeit und läßt sich in Form der flow rate variieren. Die elektrische Feldstärke wird mit der anliegenden Spannung an den Elektroden verändert.

Der zweite Effekt, die Aggregatbildung, ist natürlich unerwünscht, da aggregierte Spermatozoen nicht mehr gemäß ihrer Ladung voneinander getrennt werden können.

Gerade dieses Phänomen ist, wie die Experimente zeigen, eben-

falls abhängig von der Intensität, mit der die Samenzellen dem elektrischen Feld ausgesetzt sind.

So verursacht eine Erhöhung der Feldstärke gleichzeitig eine Verstärkung der Aggregationstendenz. Den selben Effekt hat eine Verlängerung der Verweildauer im Feld.

Aufgrund dieser Beobachtungen und unter Berücksichtigung individueller Unterschiede bei den Ejakulaten wurden die Trennungen bei Feldstärken zwischen 60 und 85 V/cm und einer flow rate von 1,0 bis 1,5 (300 - 400 ml/h), entsprechend einer Verweilzeit von 4 bis 6 min, durchgeführt.

- der Einfluß der Temperatur

Bei der Überprüfung des Temperaturfaktors auf das Trennergebnis müssen zunächst die physikalischen Auswirkungen einer Temperaturänderung berücksichtigt werden. So beeinflusst die Temperatur des Puffers nicht nur dessen Viskosität, sondern auch die elektrische Leitfähigkeit des Puffermediums. Jede neue Temperatureinstellung macht es daher erforderlich, die durch die Viskositätsänderung bedingten Turbulenzen abklingen zu lassen und außerdem die Elektrodenspannung den neuen Temperaturverhältnissen anzupassen.

Durch schrittweises Erhöhen wurde der Temperaturbereich von 5 bis 23 °C getestet. Da kein Einfluß auf den Trenneffekt bei den Spermatozoen festgestellt wurde, erschien es vorteilhaft die Temperatur möglichst hoch zu wählen, um die Lebensfähigkeit der Samenzellen nicht unnötig zu verringern. Bei elektrophoretischen Experimenten im höheren Temperaturbereich ist jedoch zu beachten, daß die Bereitschaft des Puffers zu entgasen mit steigender thermischer Energie zunimmt und das Trennergebnis durch die Entstehung von Gasblasen beeinträchtigt werden kann. Es ist daher absolut notwendig, sowohl Elektrodenpuffer, als auch Kammerpuffer vor dem Einsatz sorgfältig zu entgasen.

Fast alle präoperativen Trennungen wurden bei einer Puffer-temperatur von 20 bis 23 °C durchgeführt (siehe auch Tab.8, S. 86).

- der Einfluß des Puffersystems

Der Vorversuch B zeigte, wie unterschiedlich sich verschiedene Puffersysteme beim Elektrophoreseeinsatz verhalten. Es lassen sich jedoch keine genauen Aussagen darüber machen, inwieweit die Pufferzusammenstellung den Trenneffekt begünstigt oder verhindert, da die Erfolgsquote bei allen Experimenten ohnehin gering war.

Wie aus Tab.8, S. 86, ersichtlich, führte von den 5 verwertbaren Versuchen mit dem Puffersystem (1) kein einziger zum Trennerfolg. Zudem war die Agglomerationstendenz der Spermatozoen durch die sehr geringe Ionenstärke des Kammerpuffers erheblich und die Restmotilität gering.

Von den 4 Versuchen mit Puffersystem (2), die in der Auswertung erscheinen, erbrachte ein Experiment eine nachgewiesene Anreicherung von X- und Y- Spermatozoen. Die Agglutinationstendenz war wesentlich geringer und auch die Restmotilität der Spermatozoen war etwas besser.

Alle übrigen Versuche wurden mit Puffersystem (3) durchgeführt, auch hier war die Erfolgsrate gering, Agglutinationsrate und Restmotilität waren etwas schlechter, als mit Puffersystem (2).

4.2.1.2.3. Resultate der analytischen Aufarbeitung

Bei allen 24 präparativen Läufen, wurden die einzelnen Fraktionen auf ihre Spermatozoendichte hin untersucht.

Nur bei drei Läufen konnte eine zweigipflige Spermatozoenverteilung dokumentiert werden, ein Experiment führte zu einer dreigipfligen Verteilungskurve und bei allen übrigen Versuchen ergab die Analyse eine eingipflige Zellverteilung.

Bei 6 Läufen wurde schließlich die X-Y- Spermatozoenverteilung mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen F-body-Analyse bestimmt. Nur bei zwei Experimenten konnte eine tendenziöse Auftrennung nach X- und Y- Spermatozoen registriert werden. In beiden Fällen handelte es sich um eine Verschiebung der Y- Spermatozoen in Richtung der Anoden-nahen Fraktionen.

Abb.17 und 18 zeigen das Ergebnis dieser beiden Läufe im Diagramm:

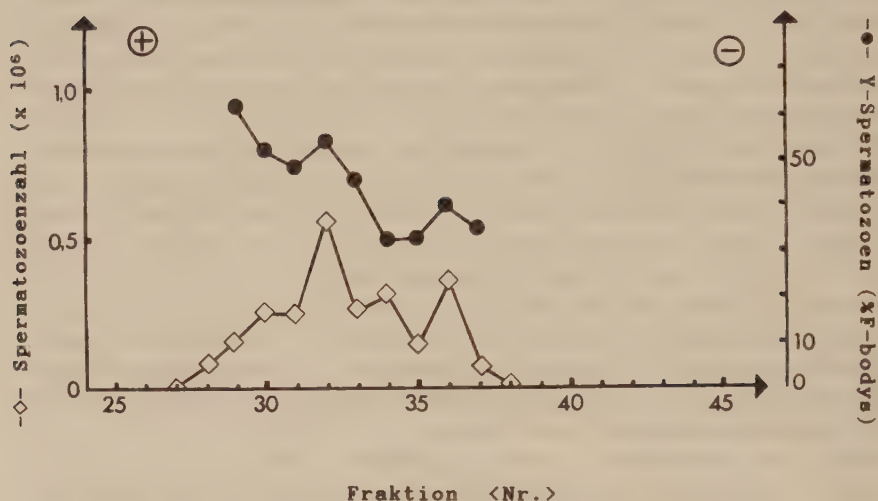


Abb.17: Lauf #8: Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis (F-body)

Wie die Kurven zeigen, verteilten sich die Spermatozoen auf eine Breite von 10 Fraktionen und bildeten dabei einen Hauptpeak (Fraktion 28 bis 35) und einen Nebenpeak (Fraktion 35 bis 37). Die Anzahl der Y-Spermatozoen (F-body-tragende Samenzellen) nimmt in Richtung der Anode, d.h. in Ablenkungsrichtung, gegenüber den X-Spermatozoen deutlich zu.

In Abb.18 ist diese X-Y-Verschiebung weniger stark ausgeprägt.

Es sollte nicht verwirren, daß sich die Anodenseite in Abb.18 rechts befindet, während sie in Abb.17 links zu sehen ist. Der Grund dafür liegt nur in der unterschiedlichen Numerierungsrichtung der Fraktionseinsätze.

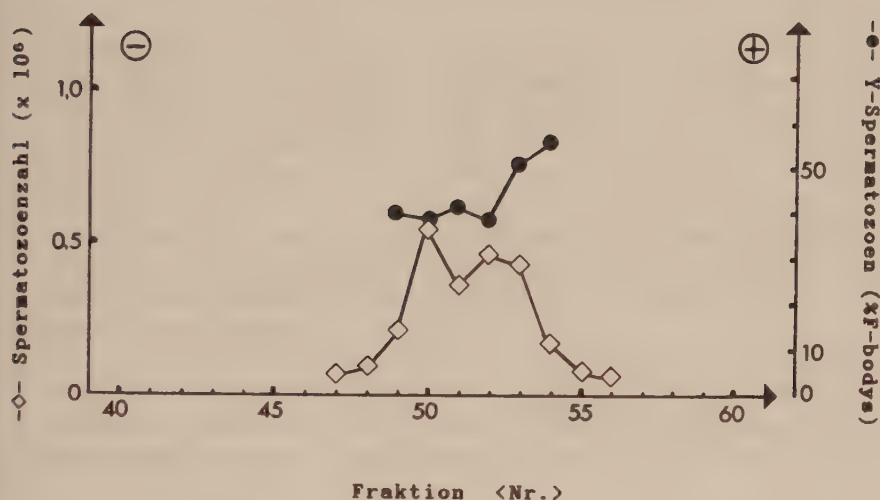


Abb.18: Lauf #10: Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis

4.2.1.2.4. Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse

Die folgende Tabelle ist eine Zusammenstellung aller 24 Experimente und dokumentiert die wichtigsten Versuchsbedingungen und Resultate.

Tab. 8:

Ejaku lat Nr.:	Trennparameter:		Temp. <°C>	visuelle Kontrolle: Auftrennung der Probe	Homogeni- tät(Aggl.)	Ergebnis Trenn- profil	der Analyse: X-Y-Relation (% -F-body's)	Moti- lität
	Puffer system	flow/Feldst. rate <V/cm>						
1	1	1,0	75	10 Frakt.	gut	1-gipfl.	46:47	< 2%
2	1	1,0	110	22 "	Aggl.+++	1- "	- *	0
3	1	1,0	50	14 "	" +	1- "	-	3-5%
4	1	1,0	100	19 "	" ++	1- "	-	< 3%
5	1	1,0	60	13 "	" ++	1- "	-	< 2%
6	2	1,5	35	6 "	gut	1- "	-	10%
7	2	1,0	35	8 "	gut	1- "	43:46	5-10%
8	2	1,0	30	11 "	gut	3- "	32:62	0
9	2	1,0	40	12 "	Aggl.+	1- "	-	5%
10	3	1,0	90	10 "	" +	2- "	35:52	5%
12	3 **	1,0	85	12 "	" +++	- *	-	-
13	3 **	1,0	80	12 "	" +	1-gipfl.	-	0
14	3 **	2,0	80	5 "	gut	1- "	-	5%
15	3 **	0,5	80	16 "	Aggl.++	1- "	-	2%
16	3	1,0	75	7 "	" +	1- "	-	< 2%
17	3	1,0	70	7 "	" +	1- "	-	4%
18	3	0,5	70	13 "	" ++	1- "	-	0
19	3	0,4	70	15 "	" ++	1- "	-	0
20	3	1,0	50	6 "	" +	-	-	-
21	3 **	1,0	75	12 "	" +	2- "	45:56	< 3%
22	3 **	1,0	75	14 "	" +	1- "	-	2%
23	3 **	1,0	75	12 "	" +	2- "	42:44	5-10%
24	3 **	1,0	80	13 "	" +	1- "	-	5%

Erläuterungen und Ergänzungen zu Tab.8:

- * Versuch wurde aufgrund zu starker Agglomerationen nicht weiter ausgewertet.
- ** bei den Experimenten 12 bis 15, sowie 21 bis 24 bedeutet die Zugabe von humanem Serumalbumin zum Kammerpuffer in verschiedenen Konzentrationen als Versuch zur Vermeidung von Spermatozoenagglomerationen.
- Die Spalte "Puffersystem" gibt an mit welchem Puffer (Puffersystem (1) bis (3)) das Experiment durchgeführt wurde, bei einigen Experimenten wurde jedoch innerhalb des Versuchs die Osmolarität bzw. elektrische Leitfähigkeit zusätzlich verändert.
- Die flow rate wird in der Skaleneinteilung des Gerätepotentiometers angegeben und entspricht ungefähr folgenden Pufferdurchflußmengen und Verweilzeiten:

flow rate	Pufferdurchfluß	Verweilzeit
0,5	130 ml/h	11 min
1,0	300 ml/h	5 min
2,0	550 ml/h	2 min

- Die Spalte "Auftrennung der Probe" bezeichnet die Bandenverbreiterung, die während der Passage des elektrischen Feldes erfolgte, angegeben in der Anzahl der Fraktionierungsschläuche, die an der Aufnahme beteiligt waren.
- Die Spalte "Homogenität" berücksichtigt die Agglomerations-tendenz der Spermatozoen.
- In der Spalte "X-Y-Relation" wird (bei erfolgter Fluoreszenzauswertung) die Fraktion mit dem niedrigsten F-body-Anteil der Fraktion mit dem höchsten F-body-Anteil gegenübergestellt.

4.2.1.3. Ergebnisse der Free- Flow- Isotachophorese

Von den 5 Einzelerperimenten, die mit diesem Verfahren durchgeführt wurden, konnte nur bei einem Trennlauf eine zweigipflige Spermatozoenverteilung in den Fraktionen registriert werden. Die übrigen 4 Trennläufe zeigten keine Trenntendenz.

Abb.19 stellt die Spermatozoenverteilung und den Anteil der F-body's in den Spermatozoen grafisch dar. Es hat eindeutig keine Separation nach X- und Y- Spermatozoen stattgefunden.

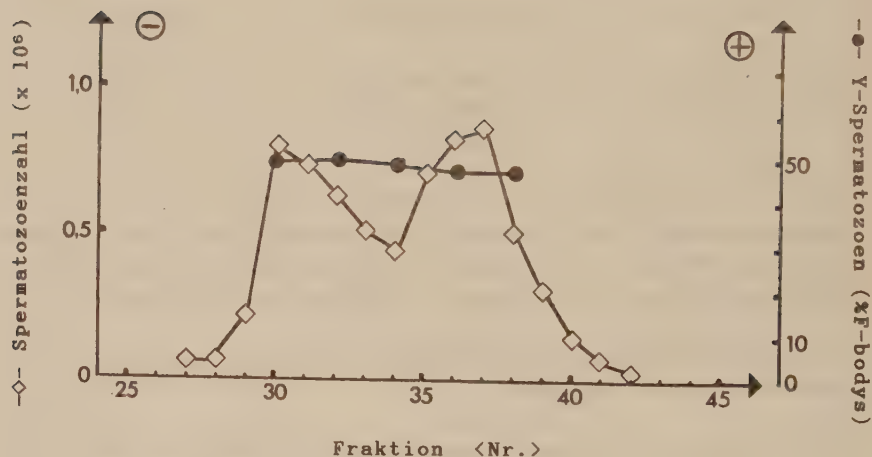


Abb.19: Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis bei der Isotachophorese menschlicher Samenzellen

4.2.2. ACE 710 UV/VIS

Die Handhabung des ACE 710 erwies sich als wesentlich einfacher und zeitsparender, als bei den vorhergehenden Versuchen mit dem Elphor VaP 21. Bedingt durch die wesentlich kleineren Abmessungen bei Trennkammer, Schlauchwegen und Puffervolumina, die eine analytische Apparatur wie den ACE 710 im Gegensatz zu einer präparativ ausgelegten Variante auszeichnen waren die einzelnen Vorbereitungsschritte, wie Reinigen und Füllen der Trennkammer, sowie die exakte Einstellung des Pufferstromes erheblich weniger zeitaufwendig. Zudem genügten schon sehr kleine Probenmengen zur Durchführung eines analytischen Laufes.

4.2.2.1. Ergebnisse der Trennexperimente (zu: 3.2.2.4.5.)

Wie bei den früheren Experimenten mit dem Elphor VaP 21, erfuhren auch bei diesen Versuchen alle Spermatozoenproben im elektrischen Feld eine Ablenkung in Richtung der Anode.

4.2.2.1.1. Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis

Von den 87 analytischen Trennexperimenten (siehe S.51), die mit diesem Gerät durchgeführt wurden, konnte bei 6 Experimenten eine klare zweigipflige Spermatozoenverteilung dokumentiert werden. Es handelte sich dabei um Ejakulate von 6 verschiedenen Spendern.

Um einen genaueren Überblick über die Ergebnisse zu bekommen, werden im folgenden die Erfahrungen in den einzelnen Versuchsgruppen (I bis VII) geschildert:

- Gruppe I (UV-Detektion)

Bei den Trennexperimenten mit dem ACE 710 UV entstanden 2- und mehrgipflige Trennprofile mit teilweise grotesk anmutenden Peaks. Es war offensichtlich, daß diese Diagramme nicht nur Ausdruck der Spermatozoenverteilungen waren, sondern daß im Kammerpuffer enthaltenes Albumin die Detektion vollkommen überlagert und die Beurteilung der Spermatozoenverteilung unmöglich macht.

Daraufhin wurde ein proteinfreier Puffer hergestellt und anschließend weitere analytische Läufe unternommen. Das Ergebnis waren zum Teil vielversprechende zweigipflige Kurven, wie sie Abb.19 und 20 zeigen. Die Auszählung der einzelnen Fraktionen ergab jedoch, daß nur ein Peak Spermatozoen enthält, sodaß der zweite Peak durch Proteine, wie Spuren von Seminalplasma, oder möglicherweise abgetrennte Oberflächenproteine der Spermatozoen verursacht worden sein muß.

Eine Proteinbestimmung nach Lowry in den entsprechenden Fraktionen zeigte eindeutig, daß der zweite Peak ein "Protein-Peak" war.

Da für alle weiteren Experimente ein Gerät mit Detektion im visuellen Bereich zur Verfügung stand, wurde auf diese Problematik nicht mehr näher eingegangen.

Auf die Bestimmung von X- und Y- Spermatozoen durch die Fluoreszenzdarstellung wurde bei diesen Versuchen verzichtet.

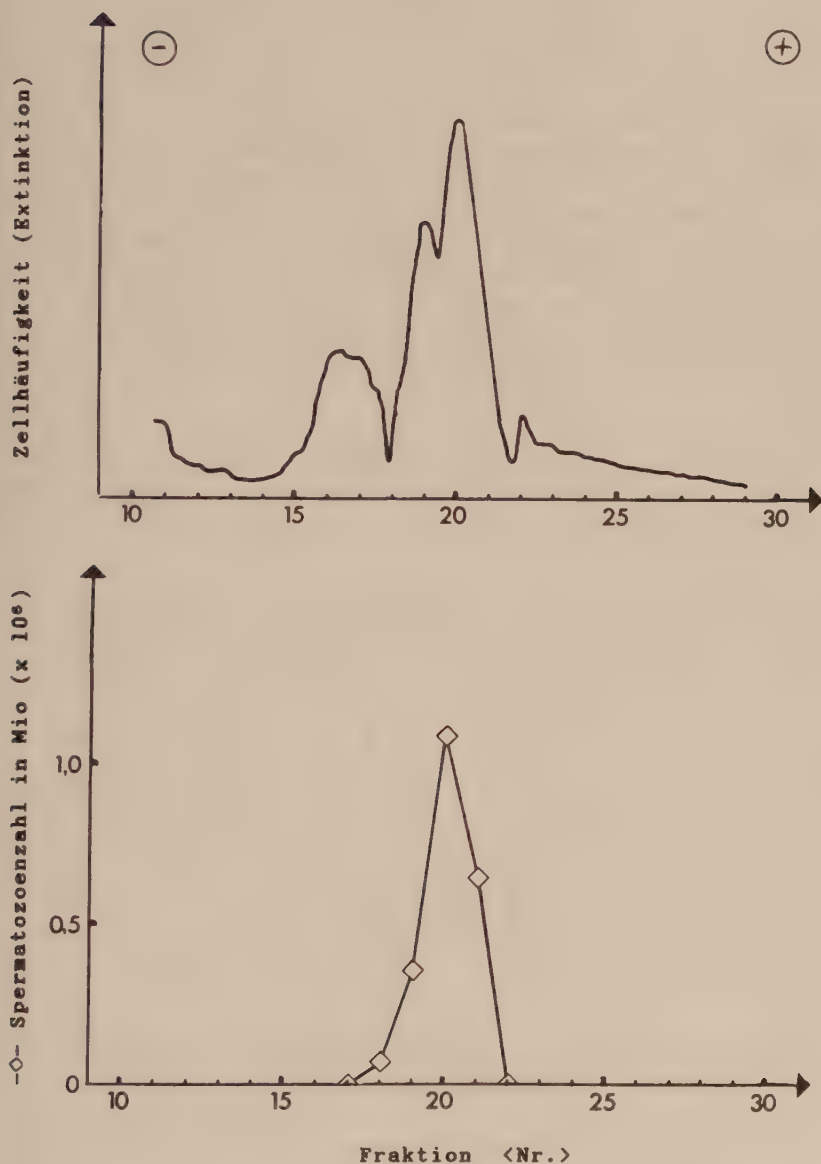


Abb.19: Gruppe I, Lauf #9, präparativ: Trennprofil (oben) und Spermatozoenverteilung (unten)

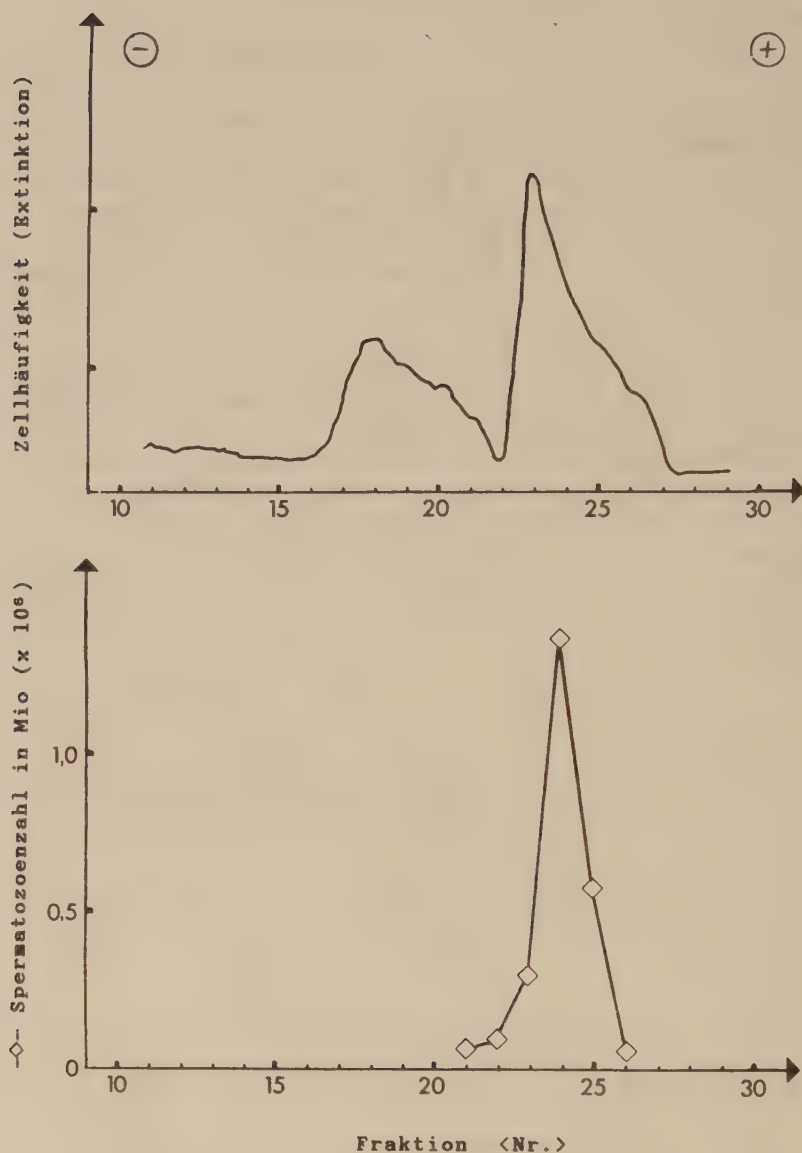


Abb.20: Gruppe I, Lauf #11, präparativ: Trennprofil (oben) und Spermatozoenverteilung (unten)

- Gruppe II

Sie umfaßt 15 Trennläufe, mit Spermatozoen, die vor der Trennung in Hank'scher Lösung gewaschen wurden. Bei zwei dieser Experimente war im Trennprofil eine Zweigipfligkeit sichtbar. Die Analyse der Fraktionen nach einem präparativen Lauf ergab in diesen Fällen eine Bestätigung der Spermatozoenverteilung sowie eine tendenziöse Auftrennung nach X- und Y-Spermatozoen, wobei die Spermatozoenpopulation mit der größeren elektrophoretischen Mobilität, gekennzeichnet durch den Anoden-nahen Peak, relativ mehr F-body-tragende Samenzellen aufweist.

In Abb.21 werden Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis grafisch dargestellt:

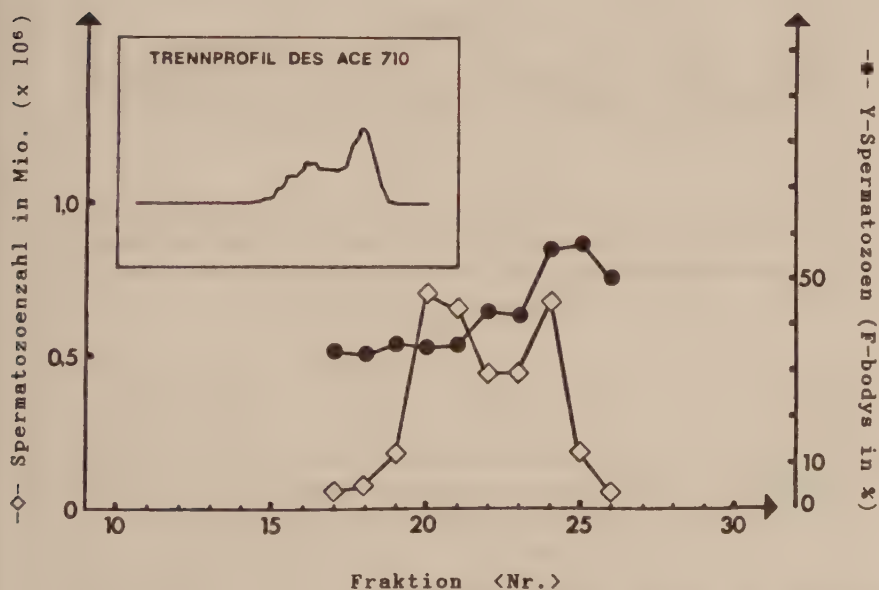


Abb.21: Gruppe II, Lauf #8, präparativ: Trennprofil, Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis (F-bodys)

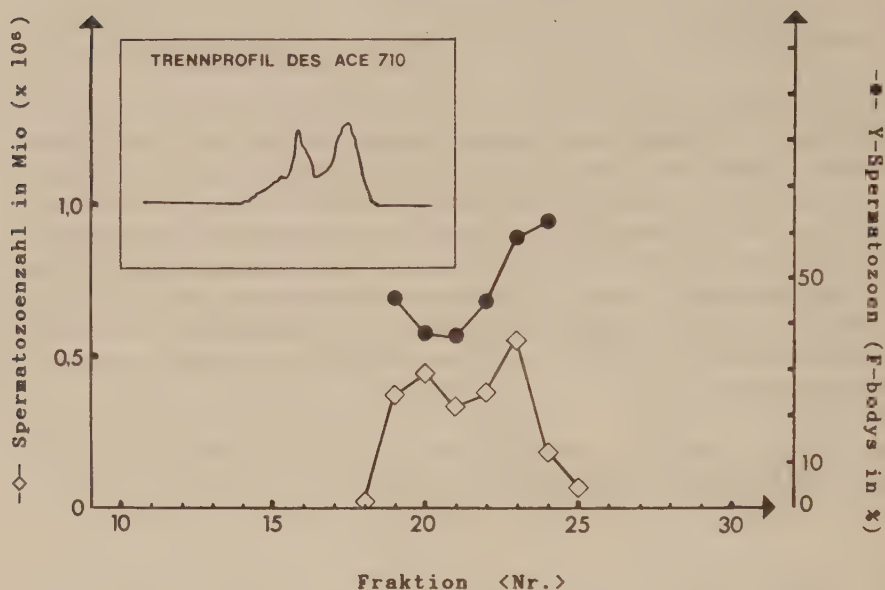


Abb.22: Gruppe II, Lauf #10, präparativ: Trennprofil, Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis

Alle übrigen Versuche ließen keinen Trennerfolg erkennen. Bei 50 Prozent aller Versuche war die Agglomerationsneigung der Spermatozoen so erheblich, daß schon aus diesem Grund kein brauchbares Trennergebnis zu erwarten war.

- Gruppe III

Diese Experimente unterscheiden sich von denen der Gruppe II nur durch die Wahl des Intermediums. Statt Hank'scher Lösung wurde zur Probenaufbereitung die bereits mehrfach erwähnte modifizierte Tyrode verwendet.

Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität sowie in der Agglomerationstendenz der Spermatozoen zu den Versuchen in Gruppe II konnten nicht beobachtet werden.

Nur ein Ejakulat versprach im Trennversuch ein positives

Ergebnis, die Resultate der Auswertung sind in Abb.23 grafisch dargestellt:

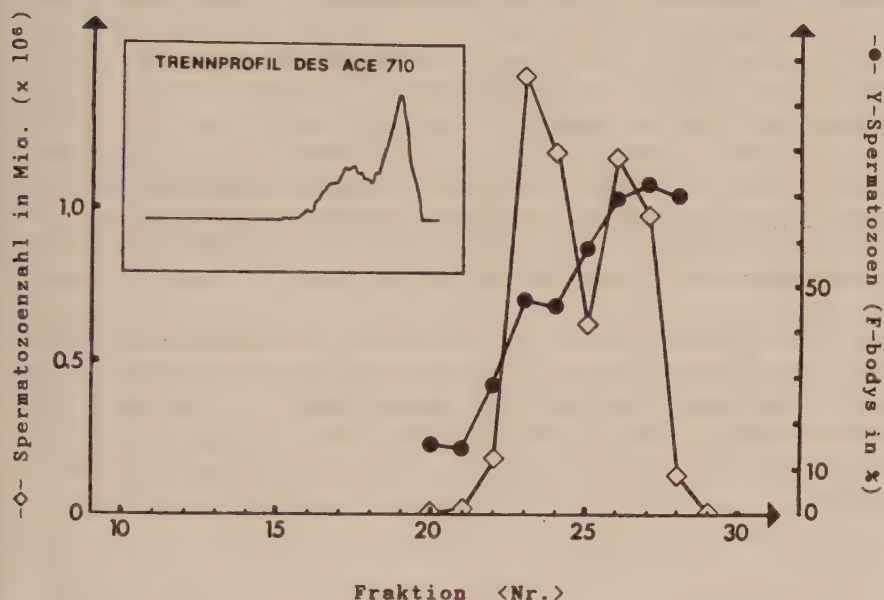


Abb.23: Gruppe III, Lauf #5, präparativ: Trennprofil, Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis

Die Auswertung des Versuchs ergab eine etwas andere Spermatozoenverteilung, als im Trennprofil durch das Detektionssystem angedeutet wurde. Diese Diskrepanz ist jedoch leicht erklärbar, wenn man bedenkt, daß das vom Computer erstellte Trennprofil nur eine Momentaufnahme darstellt, während die Auszählung der Spermatozoen in den Fraktionen den gesamten 30 minütigen Lauf umfaßt.

Erstaunlich gut war die Auftrennung nach X- und Y-Spermatozoen. In den Kathoden-nahen Fraktionen konnten nur 13 % F-body in den Samenzellen gefunden werden. Dem gegenüber stehen 70 % F-body in den beiden Anoden-nahen Fraktionen.

- Gruppe IV

Alle Ejakulate dieser Gruppe wurden nach der Aufbereitungsmethode (2) behandelt, d.h. die Spermatozoen wurden durch einen Percoll-Gradienten vorgereinigt.

Die Trennprofile, die durch das Detektionssystem erstellt wurden, unterschieden sich auffallend von denen der vorhergehenden Experimente. Anstelle einer breiten, sich über 8 bis 15 Fraktionen ausdehnenden Spermatozoenverteilung, gleichen alle Diagramme dieser Trennläufe schmalen, sauberen Gauss'schen Verteilungskurven mit einer horizontalen Ausdehnung von nur ca. 5 Fraktionen. Gleichzeitig war die Bildung von Spermatozoenagglomerationen wesentlich geringer, teilweise sogar fehlend.

Um diese Unterschiede zu verifizieren, wurden weitere Versuche unternommen, wobei 10 verschiedene Ejakulate gesplittet wurden und sowohl der Aufbereitungsmethode (1), als auch der Vorbehandlung im Percoll-Gradienten (Aufbereitung (2)) unterzogen wurden. Diese Experimente wurden in Gruppe V zusammengefaßt.

- Gruppe V

Die Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen der vorhergehenden Versuche. Wurden die Spermatozoen in Tyrodelösung gewaschen, entsprachen die Trennprofile denen der Gruppen II und III. In zwei Trennläufen konnte eine zweigipflige Spermatozoenverteilung nachgewiesen und durch präparative Auftrennung bestätigt werden (siehe Abb.26). Nur in einem Versuch gelang es, eine Verschiebung nach X- und Y-Spermatozoen nachzuweisen.

Die selben Ejakulate, nach der Aufbereitungsmethode (2) behandelt, zeigten wieder nur einen einzigen schmalen Peak ohne jede Trenntendenz.

Abb.25 stellt diese Ergebnisse bei drei verschiedenen Ejakulaten gegenüber.

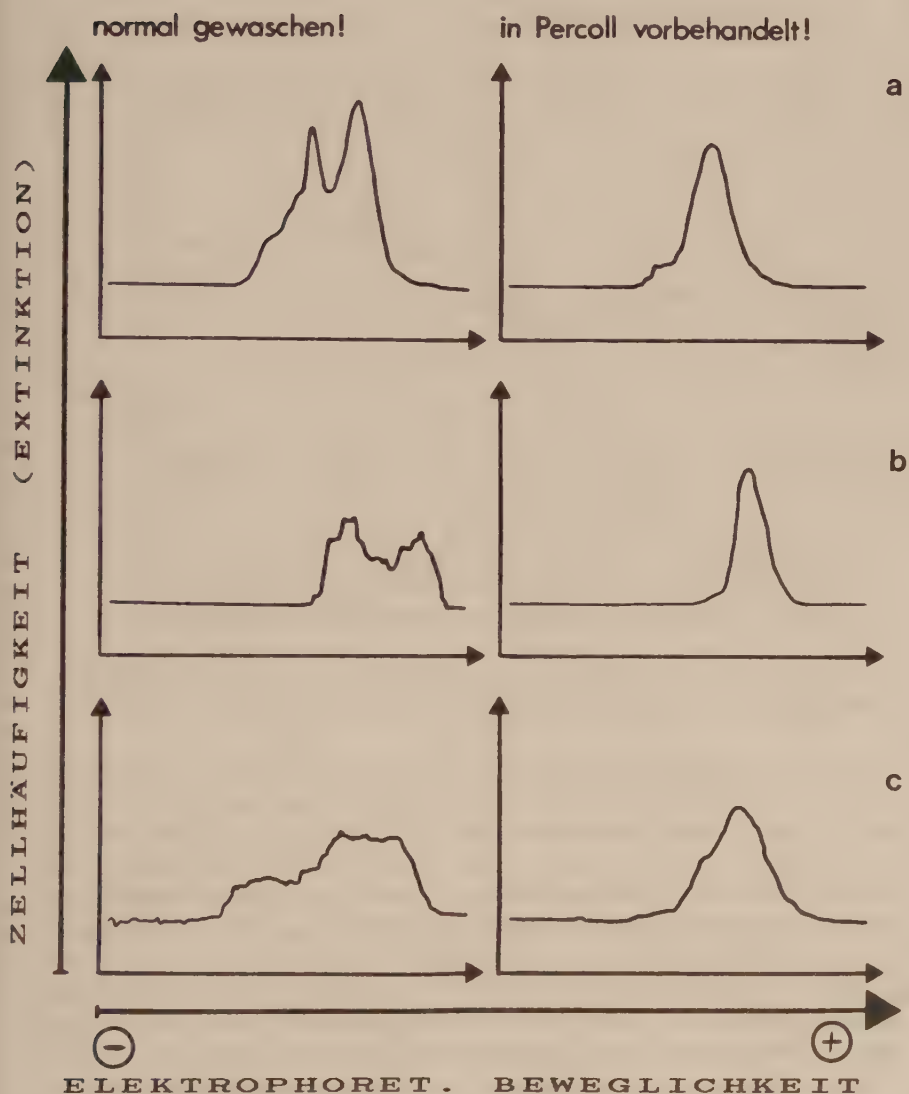


Abb.25a-c: Gruppe V, Lauf #3,4;7,8;15,16, analytisch:
Trennprofile, links: Aufber.(1), rechts: Aufber.(2)

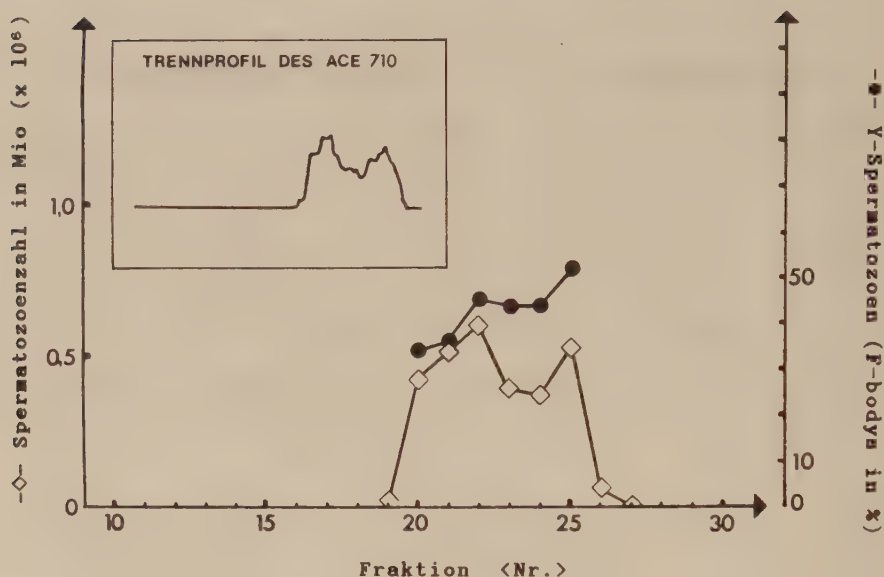


Abb.26: Gruppe V, Lauf #7, präparativ: Trennprofil, Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis

- Gruppe VI

Diese Versuchsgruppe umfaßt 10 weitere Experimente mit Tyrode als Waschsubstanz (Aufbereitung (1), Intermedium (2)), jedoch wurde bei diesen Versuchen auf Ca^{++} - Ionen verzichtet, da bekannt ist, daß ein Ca^{++} - haltiges Milieu bei Spermatozoen die akrosomale Reaktion auslösen kann und damit möglicherweise in der Lage ist, die Oberflächenladung der Spermatozoen zu verändern (siehe auch Seite 52).

Dennoch konnten keine besseren Ergebnisse als bei den entsprechenden Versuchen aus den Gruppen III und V erzielt werden. Sowohl die Trennschärfe, als auch die Agglutinations-tendenz der Samenzellen hatten sich nicht verbessert.

Nur bei einem Experiment führte ein erfolgversprechendes Trennprofil zu einer präparativen Trennung. Die Versuchsergebnisse veranschaulicht Abb.27.

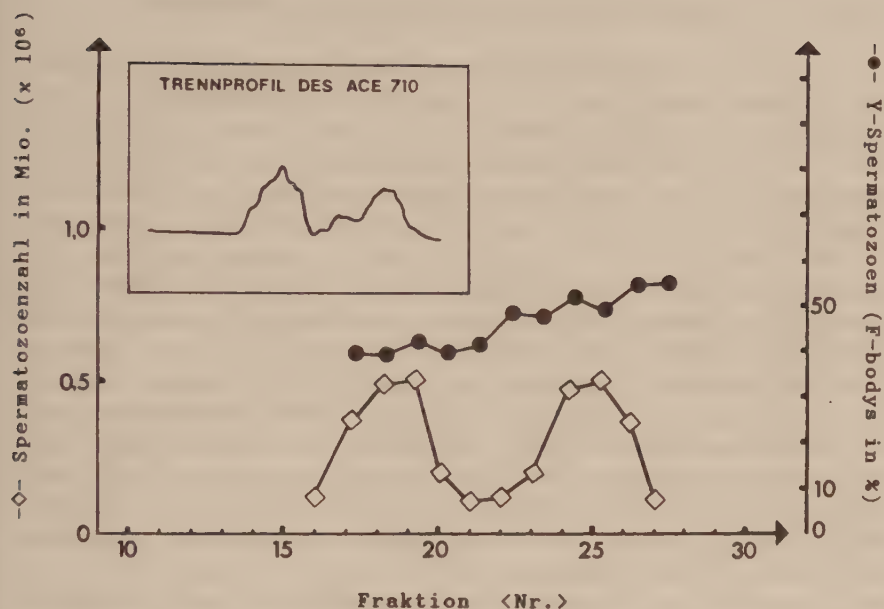


Abb.27: Gruppe VI, Lauf #6, präparativ: Trennprofil, Spermatozoenverteilung und Geschlechtsverhältnis

- Gruppe VII

Der Vollständigkeit halber wurden im Rahmen der Aufbereitungsmethode (2) Experimente mit Ca^{++} -freien Medien durchgeführt. Bei allen 5 Trennläufen wurde derselbe schmale Peak beobachtet, wie er bereits für die entsprechenden Versuche der Gruppen VI und V charakteristisch war. Dementsprechend wurde auf eine weitere Auswertung dieser Experimente verzichtet.

4.2.2.1.2. Restmotilität der getrennten Spermatozoen

Wie schon bei den Experimenten mit dem Elphor VaP 21 zeigten die Spermatozoen auch bei diesen Trennversuchen eine erhebliche Motilitätseinbuße.

Dies betrifft insbesondere die progressive Beweglichkeit der Samenzellen, die bei allen Ejakulaten und in sämtlichen Fraktionen nach Durchlaufen des elektrischen Feldes auf den Nullwert abfiel.

Betrachtete man die Ortsbeweglichkeit der Spermatozoen, so waren in den meisten Fällen noch 1 bis 5 % der Samenzellen zu verlangsamten Schwanzbewegungen fähig.

Eine geringfügige Verbesserung der Motilitätsrate konnte durch Vorlage von Tyrodelösung in die Fraktionsröhrchen (mit 1% Humanalbumin, auf 37 °C vorgewärmt) erreicht werden.

Bei manchen Ejakulaten konnte auf diese Weise der Anteil der ortsbeweglichen Zellen auf 10 % erhöht werden, ja sogar vereinzelte, progressiv-motile Spermatozoen wurden daraufhin beobachtet.

Der Anteil der ortsbeweglichen Samenzellen in den verschiedenen Fraktionen war oftmals unterschiedlich. Es war jedoch nicht möglich eine Gesetzmäßigkeit für diese Differenzen zu erarbeiten. Mögliche Gründe dafür werden im Diskussionsenteil erörtert.

4.3. Die Migrations-Sedimentations-Technik

4.3.1. Ergebnisse der Motilitätsmessungen

Die Motilitätsmessungen wurden wie in 3.2.3.4.1. beschrieben durchgeführt und folgendermaßen ausgewertet.

Aus den Mittelwerten für progressive und ortsständige Motilität, die der Bildanalyse-Computer erstellt hatte, wurde jeweils die Gesamtmotilität errechnet.

Ursprünglich sollten progressiv-bewegliche und ortsbewegliche Spermatozoen voneinander getrennt ausgewertet werden, um den Einfluß der M-S-Technik auf diese beiden Gesichtspunkte hin zu untersuchen.

Es stellte sich jedoch heraus, daß die Differenzierung in progressiv- und ortsbewegliche Zellen mit dem uns zur Verfügung stehenden Programm durch das Bildanalyse-System AT-CAS 188 nicht immer fehlerfrei ablief. So registrierte der Computer offensichtlich zu wenig ortsbewegliche Spermatozoen und rechnete diese zum Teil den progressiv beweglichen bzw. unbeweglichen Samenzellen zu. Wie verschiedene Messungen mit derselben Probe ergaben, wurde dieser Fehler konstant eingehalten, sodaß bei Berücksichtigung der Gesamtmotilität Wertevergleiche möglich waren.

Die Darstellung der Werte für die Gesamtmotilität in Abb.28 läßt einen optischen Vergleich zu.

Die Grafik zeigt den Verlauf der Gesamtmotilität - einzeln für die 5 Ejakulate - während der Zeitdauer von 6 Stunden, in der sich die Spermatozoen in dem M-S-Apparat befanden.

Das Symbol Δ auf der Zeitachse bezeichnet den Zeitpunkt der Vergleichsmessungen vor dem Einbringen in die M-S-Kammer. Dies geschah ca. 1 Stunde nach der Ejakulation.

30 Minuten später wurden die Ejakulatproben in die Kammer gegeben (Symbol $\blacktriangle$ auf der Zeitachse) und der Migrations-Sedimentations-Vorgang konnte beginnen.

Es ist deutlich zu erkennen, daß 1 bis 2 h nach Eingabe in die Kammer die Spermatozoen (die in den Bereich (c) eingewandert sind) eine merklich höhere Gesamtmotilität aufweisen, die sich z.T. in den folgenden Stunden noch weiter erhöht.

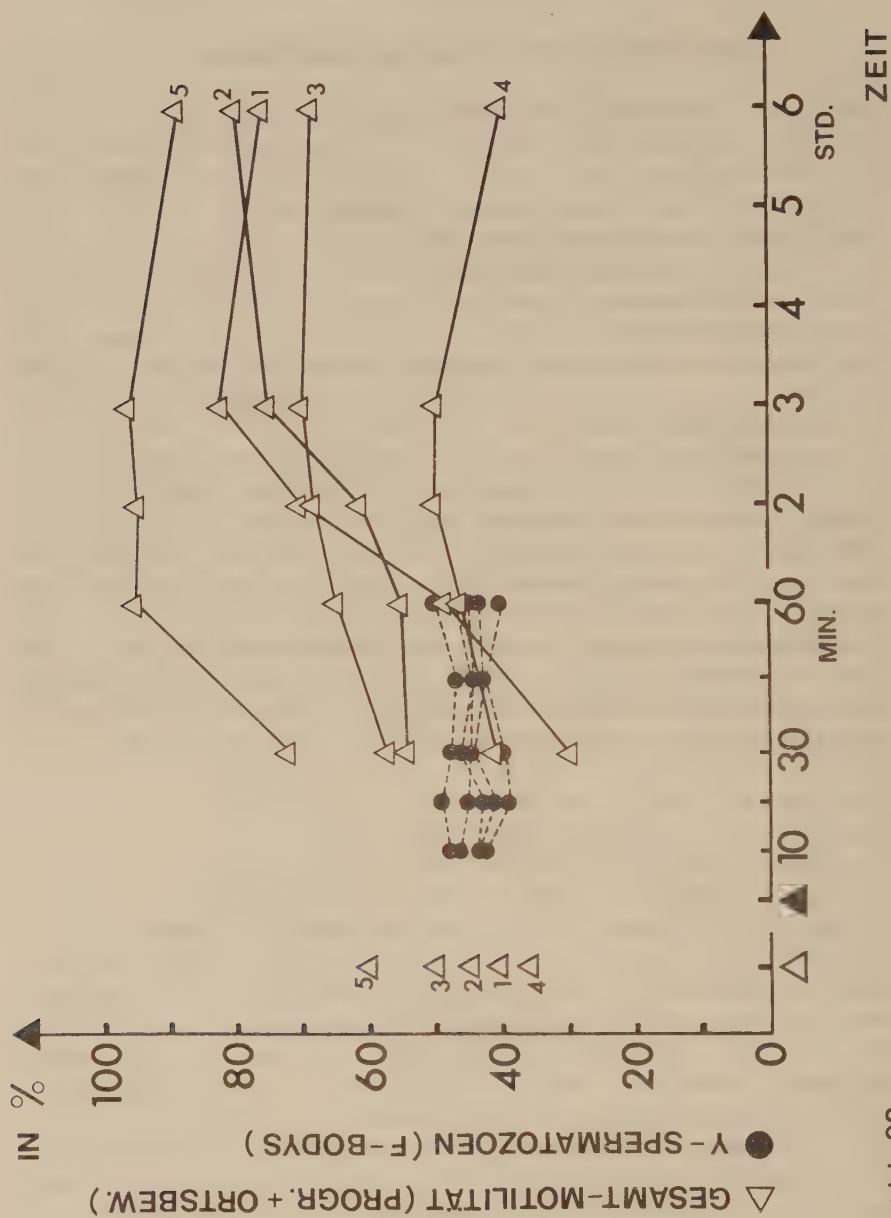


Abb. 28

Die rechnerische Auswertung der Daten ergab folgende Resultate:

Verglichen mit der Ausgangsmotilität errechnete sich prozentual ein mittlerer Motilitätszuwachs ($n=5$) von:

4 %	nach	30 min,
15 %	nach	1 h,
22 %	nach	2 h,
28 %	nach	3 h und
23 %	nach	6 h bei absteigender Tendenz.

4.3.2. X- Y- Verteilung der Spermatozoen

Die Proben für die F-body-Analyse wurden 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten nach Eingabe in die M-S-Kammer aus dem Überstand (Bereich (b)) und aus dem konischen Glasröhrchen (Bereich (c)) entnommen und getrennt verarbeitet.

Bei allen 5 Ejakulaten, beiden Entnahmeorten und zu allen Entnahmezeiten bewegten sich die Anteile der F-body-tragenden Spermatozoen zwischen 40 und 50 % von der Gesamtspermatozoenzahl.

Abb.28 veranschaulicht die F-body-Verteilung der 5 Ejakulate aus den Proben, die dem konischen Glasröhrchen entnommen wurden. Die sichtbaren Schwankungen liegen im Bereich der Fehlermöglichkeiten der Fluoreszenzmethode.

5.1. Dichtegradientenzentrifugation

Die Experimente der Gruppen (1) und (2) hatten das Ziel, menschliche Spermatozoen in einem Dichtegradienten gemäß ihrer Dichteunterschiede aufzutrennen. Die folgenden Ausführungen sollen Aufschluß über die möglichen und gesicherten Effekte und Einflüsse geben, die zu den Ergebnissen dieser Arbeit geführt haben.

5.1.1. Die Spermatozoenverteilung im Gradienten

Betrachtete man die Gradienten nach der Zentrifugation und vor der Auffraktionierung mit dem Auge gegen eine helle Fläche, so konnte man keine distinkten Banden oder Anreicherungen entdecken, sondern nur eine homogene Trübung über die gesamte Fläche des Zentrifugengefäßes.

Die grafischen Darstellungen in Abb.8 zeigen, daß sich die Samenzellen sehr gleichmäßig auf die gesamte Länge des Gradienten verteilten.

Diese Beobachtung war aus zwei Gründen auf dem ersten Blick erstaunlich. Zum einen wurde davon ausgegangen, daß sich das Trenngut in mehrere unterschiedliche Zellpopulationen aufteilt, die sich möglicherweise durch ihre Dichten unterscheiden und dadurch im Gradienten unterschiedliche Banden bilden. In Frage kommen dabei: isolierte Köpfe, isolierte Schwänze, Spermatozoen mit zwei Köpfen, X- Spermatozoen, Y- Spermatozoen, eventuelle Unterpopulationen normaler Spermatozoen (wie sie z.B. von ARCIDIACONO et al. (1983) beschrieben werden). Bei unseren Experimenten waren lediglich Spermatozoenbruchstücke und andere Zellen, wie z.B. Leukozyten, auf eine Fraktion konzentriert zu finden. Sie befanden sich in der "leichtesten" Fraktion (Fraktion 1), sedimentierten also kaum.

Der zweite Grund ist die Tatsache, daß sich das Trenngut bei Verwendung von diskontinuierlichen Gradienten bevorzugt an den Grenzflächen der einzelnen Dichtestufen anreichert. Ursachen für dieses Phänomen sind vermutlich adhäsionsartige

Kräfte an den Grenzflächen von Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Dichte und Viskosität, sowie der Widerstand, der dem Trenngut und damit der Gravitationskraft beim Erreichen einer neuen Dichtestufe entgegenwirkt.

Es gibt zwei mögliche Ursachen für die homogene Verteilung der Spermatozoen:

Erstens, die Gradienten waren durch Fehler in der Herstellung unsauber und die einzelnen Dichtestufen untereinander vermischt,

oder zweitens, die Spermatozoen bilden keine klar zu trennenden, nach Dichte differenzierbaren Populationen.

Die erste Möglichkeit konnte durch Kontrollläufe mit Marker Beads beladenen Gradienten ausgeschlossen werden. Die einzelnen Marker reicherten sich ausnahmslos und bei allen Versuchen in einzelnen Schichten an, die die Grenzflächen zwischen den Gradientenstufen darstellten (siehe Abb.4, S. 25).

Die Ursache mußte also in den Samenzellen selbst zu finden sein.

Vergleicht man die Spermatozoenverteilung von Gruppe (1) und (2) miteinander (siehe Abb.8), so fällt auf, daß bei den Experimenten der Gruppe (1) der mittlere Gradientenbereich mit den Dichten von 1,07 bis 1,10 g/ml von den Spermatozoen zahlenmäßig bevorzugt wurde. In Gruppe (2) dagegen, bei der sich die Versuche nur durch die Zugabe von Humanalbumin zum Dichtemedium und durch die vorherige Beschichtung des Zentrifugenröhrchens mit Albumin unterschieden, waren die Samenzellen weiter gewandert und verteilten sich gleichmäßig auf die Fraktionen 3 bis 8 (entsprechend der Dichten 1,07 bis 1,12 g/ml). Auch die statistischen Abweichungen von den Mittelwerten waren bei diesen Experimenten geringer.

Dies läßt darauf schließen, daß die Spermatozoen auf ihrem Weg durch das Dichtemedium von bestimmten Effekten behindert werden, die sich durch den Einsatz von Humanalbumin vermindern lassen.

Solche Behinderungen des Sedimentationsvorgangs ließen sich z.B. durch die Bildung von Agglomerationen der Samenzellen oder einer Widerstandserhöhung im Bereich der Wände des Zentrifugenröhrchens aufgrund von Wandadhäsionskräften erklären.

Eine weitere Ursache für das Fehlen von Spermatozoenbanden könnten unterschiedliche Osmolaritäten im Gradientenmedium sein. Die Dichtestufen des Gradienten wurden zwar durch den Zusatz von einem zehnten Teil einer 10-fach osmolaren Lösung auf die osmotischen Verhältnisse der Zelle eingestellt, durch die unterschiedliche Zugabe von Percoll^R und Wasser schleicht sich jedoch ein geringer Fehler ein, da Percoll^R im Gegensatz zu Wasser die Osmolalität des Mediums um ca. 20 mOsmol/l erhöht. Die Dichte oder das spezifische Gewicht eines Spermatozoon (bzw. jeder Zelle) kann jedoch keine absolute Größe sein, sondern ist vom intrazellulären Wassergehalt und damit von den osmotischen Verhältnissen abhängig. Ob durch diese geringen Osmolalitätsunterschiede die Dichten der Samenzellen trennwirksam verändert werden, muß noch offen bleiben.

5.1.2. Verfälschung der Auftrennung durch die Eigenbewegung der Spermatozoen

Bei all diesen Überlegungen wurde davon ausgegangen, daß die Spermatozoen nur passiven Kräfteeinwirkungen unterliegen. Als bewegliche Zellen sind sie jedoch auch in der Lage, aktiv im Gradientenmedium zu wandern, vorausgesetzt die Motilität der Samenzellen ist noch vorhanden. Die Komposition des Gradientenmediums berücksichtigte weitgehend die Mileuansprüche menschlicher Samenzellen, sodaß die Spermatozoen auch nach längerem Aufenthalt im Medium noch progressiv motil waren, wenn auch die Bewegungen durch die hohe Viskosität stark verlangsamt waren.

Man muß also davon ausgehen, daß der Effekt der Sedimentation durch die aktive Migration der Spermatozoen überlagert wurde. Betrachtet man die Diagramme der Abbildungen 9 und 10, so bemerkt man eine ständige Erhöhung von progressiver und ortsständiger Motilität in Richtung der "schweren" Fraktionen, sogar bis zu Werten, die die Ausgangsmotilität übersteigen. Dieses Ergebnis kann nur darauf zurückzuführen sein, daß sich die Spermatozoen aktiv in Sedimentationsrichtung fortbewegt haben und sich in den "schwereren" Fraktionen nun in prozentualer Anreicherung befinden.

Es ist anzunehmen, daß sich die Spermatozoen unter dem Einfluß einer genügend hohen Gravitationskraft mit dem Kopf in Richtung des Kraftvektors ausrichten (siehe dazu die Ausführungen von ROBERTS, 1972). In diesem Fall wäre die aktive Bewegung nur in Richtung der Sedimentation möglich. Berücksichtigt man die Ergebnisse von ERICSSON et al. (1973), die den Y-Spermatozoen eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit in viskösen und dichtegraduierten Medien zuschreiben, so könnte man annehmen, daß sich in den dichteren Fraktionen bevorzugt Androspermatozoen angereichert haben. Wie die Ergebnisse auf S. 69 und S. 75 zeigen, war dies jedoch nicht der Fall.

Um einen genaueren Aufschluß über den Migrationseffekt (= aktive Bewegung) zu erhalten, wurden Experimente durchgeführt, die durch eine kleine Modifikation diesen Migrationseffekt ausschließen sollten. Der einzige Unterschied zu den vorherigen Versuchen bestand darin, daß der Gradient vor dem Beschichten mit der Spermatozoenprobe auf 10 °C abgekühlt und diese Temperatur auch während des Sedimentationsvorgangs in der Zentrifuge durch Kühlung konstant eingehalten wurde.

Die Spermatozoen verlieren in diesem unphysiologischen Temperaturbereich fast vollständig die Fähigkeit zu Eigenbewegungen und können somit den Sedimentationsvorgang nicht verfälschen. Diese Methode ist selbstverständlich nicht geeignet, wenn die Samenzellen, besonders im Hinblick auf eine spätere Befruchtung, unter Erhaltung ihrer Motilität getrennt werden sollen.

Noch während dieser Versuche stellte sich heraus, daß die Zentrifugationsdauer auf mindestens das dreifache (2,5 h) erhöht werden mußte, um eine ähnliche, zahlenmäßige Spermatozoenverteilung zu erreichen. Dies war jedoch sicher nicht nur auf die fehlende Eigenbeweglichkeit der Samenzellen zurückzuführen, sondern in erster Linie auf die stark erhöhte Viskosität des Dichtemediums in diesem Temperaturbereich.

Die Spermatozoenverteilung war danach ähnlich homogen und es zeigten sich wieder keine Spermatozoenbanden oder Anhäufungen in bestimmten Regionen. Die X-Y-Verteilung der Samenzellen war sogar annähernd identisch mit den Resultaten der Versuche aus Gruppe (1) und (2).

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß morphologische Unterschiede der Samenzellen, bei der Auftrennung in einem Dichtegradienten die entscheidende Rolle spielen.

5.1.3. X- Y- Verteilung der Spermatozoen im Gradienten

Wie die Diagramme in Abb.11 zeigen, reichern sich im dichteren Bereich des Gradienten besonders X- Spermatozoen an, während in den "leichteren" Fraktionen die Y- Spermatozoen in der Überzahl sind. Der Umschlagpunkt befindet sich bei einer Dichte von ca. 1,08 g/ml. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten ähnlicher Untersuchungen von PORSTMANN et al. (1978) und KANEKO et al. (1984). Beide Autoren liefern jedoch keine befriedigende Erklärung für diese Ergebnisse. Ob sich die Größen- und Masseunterschiede von Gyno- und Androspermatozoen wirklich derart auf das spezifische Gewicht der Samenzellen auswirken, sodaß eine Trennung nach Dichte möglich ist, konnte bisher nicht verifiziert werden.

Nach ROBERTS (1972) ist es vielmehr das verschiedenartige Schwimmverhalten von X- und Y- Spermatozoen bei Sedimentationsbedingungen, das zu einer Trennung führen kann. In seinen Experimenten und Berechnungen haben die Y-Spermatozoen eine weitaus größere Tendenz, sich gegen die Gravitationskraft auszurichten und in den Überstand zu schwimmen, als die X-Spermatozoen, die sich fast ausschließlich positiv geotaktisch verhalten. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß dieses Verhalten auch noch bei Gravitationsbeschleunigungen von 200 bis 250 g, wie sie bei den Experimenten dieser Arbeit auftraten, anzutreffen ist. Auch die starke Motilitätserhöhung in den "schweren" Fraktionen ließe sich dadurch nicht erklären.

5.1.4. Qualität der Trennung

Die beste Auftrennung nach X-Chromosomen-tragenden Spermatozoen war jeweils in der letzten (dichtesten) Fraktion zu finden. Sie enthielt bei den Experimenten der Gruppen (1) und (2) durchschnittlich 19,9 % Spermatozoen mit F-bodys, gegenüber 80,1 % Zellen ohne F-bodys. Das beste Einzelergebnis aus allen 30 Versuchen lag bei 11 %, das schlechteste bei 28 % F-bodys. Die Spermatozoen in diesen Fraktionen waren morphologisch durchweg intakt, die Beweglichkeit der Samenzellen war selbst nach Entfernung des Dichtemediums durch 3-maliges Waschen überdurchschnittlich gut.

Die beste Auftrennung nach Y-Spermatozoen dagegen fand sich stets in der ersten Fraktion des Gradienten. Hier wurden im Mittel 62,4 % Spermatozoen mit F-bodys gefunden. Das beste bzw. schlechteste Einzelergebnis lag hier bei 72 bzw. 57 % F-body-tragende Spermatozoen. Die Fraktionen waren extrem stark mit Rundzellen, Bakterien und Spermatozoenbruchstücken verunreinigt, die Motilität der morphologisch intakten Samenzellen war bis auf 5 % vom Ausgangswert herabgesetzt.

5.1.4.1. Nachweis der X- Y- Trennung

Obwohl der F-body-Nachweis bis zum heutigen Tage die einfachste und - abgesehen vom biologischen Versuch durch Befruchtung - die sicherste Methode zur Identifizierung des Y-Spermatozoons repräsentiert, ist es eigentlich nicht zulässig, den Anteil der F-body-tragenden Spermatozoen mit dem Anteil der Y-Spermatozoen gleichzusetzen.

Man geht davon aus, daß die Spermatogenese genau 50 % Y-Chromosom-tragende Samenzellen hervorbringt. Die F-body-Analyse weist jedoch durchschnittlich nur 45 % F-bodys, nach (siehe S. 13 und S. 28), kann also 10 % der Y-Spermatozoen nicht erfassen.

5.1.4.2. Trenngüte

Berücksichtigt man diesen Fehler und stellt die Messtoleranz der Nachweismethode in Rechnung, ergibt sich aus den oben genannten Mittelwerten folgende Trenngüte:

Die beschriebene Dichtegradientenmethode erlaubt im Mittel eine Anreicherung von

X- Spermatozoen auf 78 %

und

Y- Spermatozoen auf 69 %,

wobei die Qualität der Samenzellen in der X- Spermatozoen-reichen Fraktion, im Hinblick auf Reinheit und Beweglichkeit außerordentlich hoch ist, ganz im Gegensatz zu den Fraktionen, die hauptsächlich Y- Spermatozoen enthalten.

5.1.4.3. Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse

Bei allen 30 Einzelexperimenten gelang eine Separation von Gyno- und Androspermatozoen im Sinne einer prozentualen Anreicherung. Ein Blick auf die Standardabweichungen in den Tabellen 5 und 6 macht deutlich, daß die F-body-Verteilung besonders bei den Experimenten der Gruppe (2) eine große Reproduzierbarkeit einhält.

Die beschriebene Dichtegradientenzentrifugations-Methode ist somit ein gut reproduzierbares Verfahren zur Anreicherung qualitativ hochwertiger X- Spermatozoen des Menschen.

5.1.5. Die Dichtegradientenzentrifugation als Verfahren zur Anreicherung motiler Spermatozoen

Betrachtet man die Ergebnisse der Dichtegradiententechnik besonders im Hinblick auf die unterschiedlichen Motilitätswerte in den einzelnen Fraktionen, könnte man in dieser Methode auch ein Verfahren zur Reinigung und Anreicherung motiler Spermatozoen sehen.

GORUS und PIPELEERS unternahmen 1981 ähnliche Experimente mit Percoll[®]-Dichtegradienten an menschlichen Samenzellen und fanden heraus, daß in einem kontinuierlichen Gradienten von 1,06 bis 1,14* g/ml die immobilen Spermatozoen im Bereich von 1,05 bis 1,09 g/ml hängen bleiben, während in den letzten beiden Fraktionen Anreicherungen progressiv-motiler Samenzellen zu finden sind. Es wurde jedoch bei diesen Untersuchungen nicht auf den Einfluß der Methode auf das X-Y-Verhältnis bei den Spermatozoen geachtet.

1986 veröffentlichten POUSETTE et al. entsprechende Ergebnisse mit einem Gradienten von 1,05 bis 1,12 g/ml. Auch hier fand sich eine deutliche Verbesserung der Motilitäten in den "schweren" Fraktionen, sowie eine größere morphologische Reinheit, und auch bei diesen Versuchen wurde nicht auf eventuelle Verschiebungen des Geschlechtsverhältnisses geachtet.

* Hier liegt wahrscheinlich ein Fehler vor! Die Dichte von 1,14 g/ml kann durch einen reinen Percoll-Gradienten niemals erreicht werden, da reines Percoll nur eine maximale Dichte von 1,13 g/ml aufweist.

In den Experimenten der Gruppe (3) wurden nun 10 weitere Ejakulate einer Dichtegradientenzentrifugation unter modifizierten Bedingungen unterzogen.

Wie bereits erwähnt, befindet sich der Umschlagpunkt der X-Y-Verteilung bei einer Dichte von ca. 1.08 g/ml, d.h. alle dichteren Fraktionen enthalten im Verhältnis mehr X-Chromosomen-tragende Spermatozoen. Aus diesem Grund wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit einer maximalen Dichte von 1,09 g/ml hergestellt, um den Trenneffekt nach Gyno- und Androspermatozoen möglichst auszuschließen. Alle übrigen Versuchsbedingungen blieben unverändert.

Die Ergebnisse dieser Versuche (siehe S. 70 bis S. 75) bestätigten die Vermutungen. Über 67 % der Spermatozoen befanden sich in der letzten Fraktion. Noch nach Entfernung des Dichtemediums durch 3-maliges Waschen, ließ sich gegenüber der Ausgangsmotilität eine Steigerung von durchschnittlich 32 % für die progressive und 69 % für die ortsständige Beweglichkeit feststellen. Die Samenzellen waren morphologisch durchweg normal und es gab keinerlei Verunreinigungen durch Bakterien, Rundzellen oder Zelltrümmer. Die F-body-Analyse ergab mit durchschnittlich 43 % F-bodys in der letzten Fraktion ein Verhältnis von 47 % Y-Spermatozoen gegenüber 53 % X-Spermatozoen und damit eine geringfügige Verschiebung der physiologischen Geschlechtsrelation.

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist die beschriebene Technik ein geeignetes, gut reproduzierbares Verfahren zur Verbesserung der Beweglichkeit und morphologischen Güte einer Spermatozoenprobe und zu anderen Methoden, wie z.B. dem swim-up Verfahren (MORTIMER et al. 1984) oder der M-S-Technik (siehe 3.2.3.) durchaus konkurrenzfähig. Über die Befruchtungsfähigkeit so behandelter Spermatozoen können jedoch keine Aussagen gemacht werden.

5.2. Free- Flow- Elektrophorese

Mit zwei verschiedenen Apparaturen zur trägerfreien Ablenkungs-Elektrophorese wurde das Verhalten von menschlichen Spermatozoen im elektrischen Feld untersucht. Durch geeignete Variation der Versuchsbedingungen sollten eventuelle Ladungsunterschiede von Gyno- und Androspermatozoen zur X-Y-Separation ausgenutzt werden.

5.2.1. Das Verhalten der Spermatozoen im elektrischen Feld

Bei allen elektrophoretischen Experimenten dieser Arbeit wurde die Strömungsbahn der Spermatozoensuspension in der Kammer zur Anode hin gleichmäßig abgelenkt, d.h. die Samenzellen besitzen im physiologischen pH-Bereich eine negative Nettoladung, die sich auch im Verlauf der Trennung, also während der Passage des elektrischen Feldes, nicht wesentlich ändert. Die Strömungsbahn verbreiterte sich dabei durch den Einfluß der elektrischen Potentialdifferenz um das 10 bis 50-fache der ursprünglichen Bahnbreite. Es erfolgte also eine örtliche (fraktionierbare) Auftrennung der Samenzellen nach ihren Ladungsunterschieden. Entscheidend für die Beurteilung dieser Auftrennung war nun die Spermatozoenverteilung in den einzelnen Fraktionen, die auch als Trennprofil bezeichnet wird. Das Ziel war die Separation der Spermatozoenprobe in zwei getrennte Populationen von X- und Y- Spermatozoen, wie sie von KANEKO et al. (1983/84) mit den selben Versuchsanordnungen bereits beschrieben wurde.

Trotz systematischer Variation und Modifikation der Versuchsbedingungen, konnten von 24 Trennläufen mit dem Elphor VaP 21 nur 3 zweigipflige (und in einem Fall eine dreigipflige) Auftrennungen erreicht werden. Die anschließenden Experimente mit dem ACE 710 führten lediglich in 6 von 87 Einzelexperimenten zu einer klaren zweigipfligen Spermatozoenverteilung. Zwar konnte durch gezielte Manipulation der Trennparameter das Verhalten der Samenzellen beeinflußt werden - z.B. Verbreiterung des Trennprofils durch höhere Feldstärken oder

längerem Aufenthalt in der Trennkammer - jedoch ließen sich dadurch nur bereits vorhandene Effekte verstärken.

Einen wesentlichen Einfluß auf das Verhalten der Spermatozoen im elektrischen Feld hatte dagegen die Vorbehandlung der Samenzellen vor der Injektion in die Trennkammer. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Spermatozoen, vor dem Eintritt in den Kammerpuffer, mit Tyrode oder Hank'scher Lösung gewaschen wurden. Die Vorreinigung der Samenzellen in einem Percoll[®]-Gradienten, die laut Mitteilungen von Herrn Kaneko auch von seiner Arbeitsgruppe angewandt wird, war dagegen in allen Fällen unbrauchbar (KANEKO et al. 1986). Ganz offensichtlich bewirkt der Kontakt mit dem Gradientenmedium Percoll[®] eine Nivellierung der Oberflächenladungen der Spermatozoen und zerstört damit die Grundlage für eine Trennung.

5.2.2. Unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit von X- und Y- Spermatozoen

Bei besonders breiten Trennprofilen und natürlich bei allen zweigipfligen Auftrennungen wurde der Anteil an Y- Spermatozoen mit Hilfe der F-body-Analyse untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, daß bei einigen Trennläufen die elektrophoretische Beweglichkeit der Y- Spermatozoen größer war, als die der X- Spermatozoen, d.h. die Y- Spermatozoen wurden weiter abgelenkt und waren bevorzugt in den Anoden-nahen Fraktionen zu finden. Dies traf besonders auf die zweigipfligen Spermatozoenverteilungen zu. Die übrigen Auftrennungen ließen keine Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses erkennen.

Diese Resultate stehen jedoch völlig im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen von Herrn KANEKO und seiner Arbeitsgruppe, der bei seinen Experimenten eine höhere elektrophoretische Beweglichkeit für die X- Spermatozoen nachweist. Frühere Untersuchungen über das elektrophoretische Verhalten von Samenzellen deuten jedoch darauf hin, daß es doch die Androspermatozoen sind, die im elektrischen Feld eine stär-

kere Ablenkung zur Anode hin erfahren (SCHILLING et al. 1969, SHIRAI et al. 1974).

Die Erklärung für die elektrophoretische Beweglichkeit der Spermatozoen ist die zahlenmäßige Überlegenheit negativ geladener Gruppen auf der Spermatozoenoberfläche. Wie schon auf S. 17 erwähnt, sind es neben reinen Proteinen und Lipoproteinen besonders nach außen projizierte, kovalent gebundene Glykoproteine, die dafür in Frage kommen, wobei von KANEKO (1984) dafür besonders solche mit Sialinsäureresten verantwortlich gemacht werden. Die Oberflächenstruktur von Gyno- und Androspermatozoen soll besonders in der Anwesenheit solcher Sialinsäurereste differieren, da eine Behandlung der Samenzellen mit Sialidase einen vorher vorhandenen Trenneffekt aufhebt.

5.2.3. Qualität der Trennung

Selbst die Trennversuche, bei denen sich eine Separation von Gyno- und Androspermatozoen abzeichnete, waren in der Güte der Auftrennung sehr unterschiedlich. Die Trennkurven (Elphor: S. 84/85, ACE: S. 93-99) zeigen, daß es in den meisten Fällen nicht gelang, zwei räumlich voneinander getrennte Spermatozoenpopulationen zu produzieren, vielmehr entstanden zwei, sich überschneidende Peaks, die keine exakte Separation nach X- und Y- Spermatozoen erwarten ließen.

Das beste Trennergebnis (ACE: Abb.23, S. 95) zeigte eine Anreicherung von Y- Spermatozoen in den Anoden- nahen Fraktionen auf 77 %, gegenüber maximal 84 % X- Spermatozoen in den Kathoden-nahen Fraktionen (dieser Wert konnte jedoch nur in den beiden äußersten Fraktionen gemessen werden, die eine sehr geringe Spermatozoendichte aufwiesen).

Unter Berücksichtigung des Fehlers, der sich durch die Anwendung der F-body-Analyse ergibt (siehe S. 109), erlaubte die Free- Flow- Elektrophorese eine Anreicherung der

X- Spermatozoen auf 55 % bis 84 %

im Kathoden-nahen Peak und eine Anreicherung der

Y- Spermatozoen auf 58 % bis 77 %

im Anoden-nahen Peak.

5.2.4. Reproduzierbarkeit der Trennung

Die Experimente mit dem Elphor VaP 21 dienten in erster Linie zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen. Durch die ständigen Modifikationen dieser Bedingungen ist es nicht sinnvoll, eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu machen.

Anders dagegen bei den Trennexperimenten mit dem ACE 710. Nachdem sich gezeigt hat, daß die Vorbehandlung der Spermatozoen mit Percoll® eine Separation der Samenzellen verhindert (siehe Abb.25, S. 97) und die Experimente der Gruppe (1) durch die inadequate UV-Detektion nicht auswertbar waren, standen noch genau 50 Einzelexperimente mit 50 verschiedenen Ejakulaten zur Verfügung, von denen 6 Trennläufe zu einer Anreicherung nach X- und Y- Spermatozoen führten. Dies entspricht einer Erfolgsquote von 12 %.

Leider war es nicht möglich, die Reproduzierbarkeit des Trennerfolgs bei ein und demselben Spender nachzuprüfen, da diese als Patienten der andrologischen Sprechstunde jeweils nur einmal zur Verfügung standen.

5.2.5. Die Motilität der Spermatozoen nach der Trennung

Die Beweglichkeit der Spermatozoen war nach der Passage des elektrischen Feldes erheblich vermindert. Zwar konnten geringfügige Unterschiede beim Einsatz verschiedener Puffersysteme beobachtet werden, die entscheidende Rolle scheint jedoch das elektrische Feld auszuüben. Bewegten sich die Spermatozoen, ohne Anlegen einer elektrischen Spannung durch die Trennapparatur, so wurden nur geringe Motilitätsverluste gemessen. Nach Aufbau des elektrischen Feldes nahm die Motilitätsrate in Abhängigkeit zur Feldstärke jedoch drastisch ab. Die Gesamtmotilität lag durchschnittlich unter 10 %, die progressive Beweglichkeit unter 2 % von den Ausgangswerten.

5.2.6. Diskussion der Störmöglichkeiten

Die möglichen Gründe für die unterschiedliche Trenngüte und mangelnde Reproduzierbarkeit der Versuche sollen im folgenden erörtert werden.

5.2.6.1. Apparatur-bedingte (technische) Fehlermöglichkeiten

Darunter sind Mängel an der Trennapparatur zu verstehen, die entweder die Separation in der Kammer verhindern oder stören oder aber die Spermatozoen beschädigen. Offensichtliche Mängel an den Geräten, wie sie schon auf S. 80 beschrieben wurden, führten ohnehin zum Abbruch oder zur Wiederholung des Trennlaufs. In Frage kämen also versteckte Mängel, die vom Experimentator nicht bemerkt wurden, wie z.B.

- Störung des Separationsvorgangs durch unvollständig oder unzureichend beschichtete Trennkammerwände,
- Beschädigung der Spermatozoen durch leicht geknickte, geringfügig demolierte oder zu dünne Injektionsschläuche (besonders bei Elphor VaP 21),
- Beschädigung der Spermatozoen durch zu große physikalische Belastung in der Schlauchpumpe (nur bei ACE 710 möglich).

5.2.6.2. Unterschiede im Spermatozoenmaterial

Die mangelnde Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse bei Ejakulaten verschiedenen Spender, läßt zunächst an individuelle Unterschiede im Spermatozoenmaterial denken. Dies würde bedeuten, daß Art und Anzahl der Oberflächenladungen an den Spermatozoen nicht artspezifisch determiniert werden, sondern individuellen Einflüssen unterliegen. In Frage kommen dafür

- individuelle Größenunterschiede der Samenzellen, besonders der Gesamtoberfläche,
- Diskrepanzen in der Membranbeschaffenheit (z.B. unterschiedliche Lipid- und Proteinstrukturen),

- Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit der Spermatozoen, besonders des Akrosom oder Plasmalemm, gegenüber physikalischen, chemischen und elektrochemischen Einflüssen
- individuell bedingte frühzeitige Ablösung der Akrosomenkappe, und damit Änderung der Oberflächenstruktur.

Entscheidend für eine elektrophoretische Trennung ist also die Membranbeschaffenheit der Samenzelle, die zumindest zum Teil genetisch determiniert ist.

Autoradiographische Untersuchungen mit mRNA haben ergeben, daß im reifen Spermatozoon keine Transkription mehr stattfindet, die für die Aufrechterhaltung der vitalen Funktionen des Spermatozoon notwendigen Enzyme, werden vermutlich durch Translation, mit im Cytoplasma gespeicherter mRNA hergestellt. Im Laufe der Spermatogenese, bis zum Beginn der Kernkondensation im späten Spermatiden, wird die Entwicklung des Spermatozoon zum einen, durch transkriptive Vorgänge in der Zelle (KIBRSZENBAUM 1974, STERN et al. 1983) zum anderen, durch Enzyme der Geschlechtsdrüsen gesteuert. Unterschiedliche Membranbeschaffenheit durch individuelle Genexpression ist also durchaus denkbar und kann ein Grund für die schlechte Reproduzierbarkeit der Trennversuche sein.

Wenn man die Diskrepanz der Ergebnisse von KANEKO's Arbeitsgruppe und den eigenen Resultaten betrachtet, drängt sich die Frage auf, ob es nicht speziesspezifische Eigenheiten an den Spermatozoen sind, die zu den gegensätzlichen Ergebnissen führen. Ob nun Menschen der asiatischen Rasse - die bei den Versuchen von KANEKO et al. das Untersuchungsmaterial lieferten - sich auch im biochemischen Aufbau der Spermatozoenoberfläche gegenüber Personen kaukasischer Rassenzugehörigkeit unterscheiden, gehört in den Bereich der Spekulation. Es war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht möglich, mit Spendermaterial verschiedener Rassen zu experimentieren.

5.2.6.3. Einflüsse durch Bestandteile im Seminalplasma

Eine Änderung der negativen Oberflächenladungen ist auch durch Enzymaktivitäten im Seminalplasma möglich. Glykosidasen und Neuraminidasen wurden im Seminalplasma nachgewiesen, und besonders die letzteren könnten negativ geladene Gruppen abbauen. Hier könnte eine sofortige Behandlung (möglichst gleich nach der Ejakulation) mit Neuraminidase-Hemmern helfen.

5.2.6.4. Effekte durch Manipulationen am Probenmaterial

Hierunter fallen physikalische und chemische Einflüsse, die vor, während und nach der Trennung auf die Spermatozoen einwirken.

Die erste Traumatisierung der Samenzellen kann durch die Zentrifugation und Umpufferung in ein anderes Medium entstehen. Durch die Entfernung des protektiv wirkenden Seminalplasmas werden die Zellen aus ihrem gewohnten Milieu herausgerissen und müssen sich den neuen chemischen Veränderungen anpassen. Dieser Anpassungsvorgang wird ausschließlich über die Zellmembran (Plasmalemm) in Form von Ionentransporten geregelt. Zu schnelle Umpufferung kann die Stabilisierungskapazität der Zellmembran überfordern und zu einer Schädigung des Plasmalemm oder der Akrosomenkappe führen. Da die Zelle in ständigem Austausch mit dem umgebenden Medium steht, werden Ionen- und Wasserhaushalt und auch die Verteilung elektrisch geladener Gruppen durch das extrazelluläre Milieu beeinflusst. Als Beispiel dafür sei nur an den Effekt von Percoll^R erinnert, der mit einer Veränderung der Oberflächenladungen auf den Spermatozoen einherging.

Rein physikalischen Belastungen werden die Spermatozoen beim Zentrifugieren und der Filtration durch das Nylongewebe ausgesetzt. Diese Manipulationen können bei einem Teil der Spermatozoen zur Beschädigung der Zellmembran und damit zum Tod der Samenzelle führen.

5.2.6.5. Einflüsse durch das elektrische Feld

Die Ergebnisse der Trennversuche haben gezeigt, daß die Anwesenheit eines Ionenflusses im Trennmedium, als Folge der Potentialdifferenz des elektrischen Feldes, eine schädigende Wirkung auf die Spermatozoen ausübt. So konnte beobachtet werden, daß mit steigender Feldstärke, die Motilität der Samenzellen abnimmt (siehe S. 116), die Tendenz zur Aggregatbildung jedoch stark zunimmt (siehe S. 80/82).

Es ist durchaus möglich, daß Y- Spermatozoen durch das elektrische Feld stärker beeinträchtigt werden als X- Spermatozoen und dadurch der Trennerfolg in Frage gestellt wird.

Folgende Einflüsse durch das elektrische Feld auf die Samenzellen sind dabei denkbar:

- Durch die Ausrichtung der elektrischen Feldlinien kann es zu einem Ladungsgradienten innerhalb der Zelle kommen (Dipolbildung). Als Folge kann eine Störung der Kompartimente in der Zelle und der damit verbundenen chemischen Reaktionen auftreten.
- Die Anwesenheit einer elektrischen Potentialdifferenz kann elektro-chemische Vorgänge in der Zelle stören. Dabei sei besonders an die Reaktionen der Atmungskette in den Mitochondrien gedacht. Eine Beeinträchtigung der ATP-Synthese auf diesem Weg, könnte den Motilitätsabfall der Spermatozoen erklären.
- Durch den Austritt von Makromolekülen aus der Zelle könnte die Zahl der negativen Oberflächenladungen verändert werden. In Frage kommen Proteine und Nukleinsäuren, die selbst über geladene Gruppen verfügen. Der Austritt von DNA aus Zellen, unter dem Einfluß des elektrischen Feldes, ist bereits von ZEILLER et al. (1975) beschrieben worden. Eine Vorbehandlung der Spermatozoen mit DNase könnte in diesem Fall helfen.
- Ebenso kann der Eintritt von geladenen Molekülen sowohl Stoffwechselvorgänge, als auch die Zellarchitektur stören.

Für den Trennerfolg ganz entscheidend ist dabei, ob Veränderungen an der Zellmembran auftreten, die in jedem Fall zu Verschiebungen der Oberflächenladungen führen können.

Mögliche Membranveränderungen sind:

- Abtrennung von Membrankomponenten (Proteine, Lipide, Glykoproteine); kann führen zu:
- gestörtem Ionentransport durch Veränderung der Permeabilität,
- Aufhebung der Interaktion zwischen Membran und Zytoplasma,
- Veränderung der Membranarchitektur,
- Verlust von Zellbestandteilen durch Membrandefekte und damit auch
- Verlust von Ladungen.

5.3. Die Migrations-Sedimentations-Technik

5.3.1. Eine Technik zur Anreicherung motiler Spermatozoen

Die Ergebnisse (siehe S. 101-103) zeigen deutlich, daß durch den Ortswechsel der Spermatozoen vom Ringbereich der M-S-Kammer (a) in das konische Innengefäß (c) eine Anreicherung der motilen Samenzellen stattgefunden hat. Durch ihre progressive Beweglichkeit verlassen die Samenzellen das Ejakulat und müssen nur eine kleine Hürde überspringen, um danach in das innere Glasröhrchen zu sedimentieren. Im Laufe der Zeit finden immer mehr Zellen den Weg in das Auffanggefäß, sodaß sich größere Spermatozoenmengen anreichern können. Dies ist ein Vorteil gegenüber der swim-up Methode, bei der die Zellenentnahme nur aus dem Überstand erfolgen kann, aus dem immer wieder motile Zellen absedimentieren.

Die besten Werte für die Gesamtmotilität wurden 3 Stunden nach Eingabe in die M-S-Kammer gemessen. Die Gesamtbeweglichkeit hatte sich nach dieser Zeit gegenüber den Ausgangswerten im Mittel um 28 Prozentpunkte verbessert.

Bei den 5 getesteten Ejakulaten konnte die Gesamtmotilität von durchschnittlich 46 % (36 -60 %) auf durchschnittlich 75 % (50 -96 %) gesteigert werden.

Die in der Literatur von TEA et al. (1986) angegebene Motilitätsverbesserung um durchschnittlich 42 Prozentpunkte konnte damit nicht ganz erreicht werden.

5.3.2. Verhalten von X- und Y- Spermatozoen in der M-S-Kammer

Wenn man von einem unterschiedlichen Wanderungsverhalten von Gyno- und Androspermatozoen ausgeht (siehe S. 10), wäre es durchaus möglich, daß sich X- und Y- Zellen in verschiedenen Bereichen der Kammer anreichern. Falls z.B. Y- Spermatozoen wirklich eine größere Tendenz haben, in den Überstand zu schwimmen, X- Spermatozoen dagegen vermehrt sedimentieren (ROBERTS 1972), müßte man, besonders in der ersten Zeit nach Start des Experimentes, im Überstand mehr Y- Zellen finden,

im Sediment dagegen eher X- Spermatozoen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Zu keiner Zeit konnten weder im Überstand, noch im Auffanggefäß Anreicherungen von X- oder Y- Spermatozoen gefunden werden. Falls solches unterschiedliche Sedimentationsverhalten zwischen X- und Y- Spermatozoen wirklich existiert, war die Versuchsanordnung nicht geeignet, diese zu einer Separation auszunützen.

5.4. Schlußfolgerungen

Die Versuchsergebnisse haben gezeigt, daß es prinzipiell möglich ist, menschliche Spermatozoen nach X- und Y- Chromosom-tragenden Zellen anzureichern bzw. aufzutrennen.

Das hier beschriebene Verfahren zur Dichtegradientenzentrifugation erlaubt eine gut reproduzierbare, fast 80 %ige Anreicherung von gereinigten und überdurchschnittlich beweglichen X- Spermatozoen.

Nachdem die Penetrationsfähigkeit, von im Percoll^R- Gradienten behandelten Spermatozoen, im Hamsterei-Test bestätigt worden ist (BERGER et al. 1985), sollte nun auch die Befruchtungsfähigkeit der aufgetrennten Samenzellen im biologischen Versuch erprobt werden. Sollte sich herausstellen, daß eine Insemination mit solchen Samenzellen vom medizinischen Standpunkt aus unbedenklich ist, so könnte durch dieses Trennverfahren das Risiko der Geburt eines X-chromosomal geschädigten männlichen Kindes (bei entsprechender genetischer Prädisposition der Mutter) bis auf 20 % vermindert werden.

Damit wäre erstmals eine Beeinflussung des Geschlechts der Nachkommenschaft als therapeutische Maßnahme möglich.

In abgewandelter Form kann diese Methode auch zur Reinigung und Motilitätsanreicherung menschlicher Samenzellen genutzt werden. Es gelang ein modifiziertes Verfahren zu entwickeln, das Samenzellen im Dichtegradienten nach ihrer Motilität und nach morphologischen Gesichtspunkten anreichert, ohne gleichzeitig eine Auftrennung nach X- und Y- Spermatozoen zu bewirken.

Auch die Free- Flow- Elektrophorese kann zur Separation von Gyno- und Androspermatozoen herangezogen werden. Das Verfahren ist jedoch noch nicht so weit ausgereift, um reproduzierbare Trennergebnisse zu liefern. Auch die Lebensfähigkeit und Motilität der Samenzellen wird durch diese Methode noch erheblich beeinträchtigt. Hier sind noch umfangreiche Untersuchungen zur Optimierung dieser Methode erforderlich. Es ist

außerdem bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar, ob die Spermatozoen bei der Trennung im elektrischen Feld eventuell Beschädigungen am genetischen Material erleiden, die ihren therapeutischen Einsatz verbieten würden.

Der Beweis für die Effektivität der Trennverfahren wurde durch die F-body-Analyse (Fluoreszenzmarkierung mit Quinacrin) erbracht. Leider existiert noch kein vergleichbarer Test zur Identifizierung des X-Chromosoms im Spermatozoon, der als Gegenprobe zur F-body-Bestimmung eingesetzt werden könnte.

Eine eindeutige Charakterisierung des Geschlechtschromosoms ist letzten Endes nur durch die Erstellung eines Karyogramms aus dem haploiden Kern des Spermatozoon (RUDAK et al. 1978) oder durch die Verwendung geschlechtschromosomspezifischer DNA-Sonden (JOSEPH 1984) möglich.

Die Migrations-Sedimentations-Technik nach TEA ist eine leistungsfähige Methode zur Anreicherung motiler Spermatozoen.

Das natürliche Gleichgewicht von X- und Y- Spermatozoen wird durch dieses Verfahren nicht beeinflusst.

Zwei unterschiedliche Trennverfahren wurden zur selektiven Anreicherung geschlechtsspezifischer Spermatozoen herangezogen:

Die diskontinuierliche, isopyknische Dichtegradientenzentrifugation, mit Percoll[®] als Trennmedium, erwies sich als eine leistungsfähige Methode zur selektiven Anreicherung von X-Spermatozoen.

In einem Dichtespektrum von 1,04 bis 1,12 g/ml, verteilt über 8 Stufen, wurden insgesamt 30 Ejakulate (von 30 verschiedenen Spendern) bei 250 g und 20 °C für 40 min zentrifugiert. Die anschließende Analyse der 8 Dichtestufen zeigte eine (im Durchschnitt) 78 %ige Anreicherung von X-Spermatozoen in der "schwersten" Fraktion, gegenüber einer etwas geringeren Anreicherung der Y-Spermatozoen auf durchschnittlich 69 % in der "leichtesten" Fraktion.

Die Qualität der Spermatozoen war jedoch sehr unterschiedlich.

Die X-Spermatozoen-reichen Fraktionen zeichneten sich durch überdurchschnittlich bewegliche, morphologisch einwandfreie Zellen aus, während die "leichteren" Fraktionen, die vermehrt Y-Spermatozoen enthielten, mit abnehmender Dichte stark verunreinigt waren und viele defekte und unbewegliche Samenzellen enthielten.

Neben einer Separation von Gyno- und Androspermatozoen konnte auch eine Selektion der Spermatozoen nach ihrer Motilität beobachtet werden.

Durch eine Modifikation des Gradienten (1,04 bis 1,09 g/ml) gelang es zusätzlich, ein Verfahren zur Reinigung und Motilitätsverbesserung (Steigerung der Gesamtmotilität um ca. 50 %) für Spermatozoen zu entwickeln. Das Geschlechtsverhältnis der Samenzellen wird in einem solchen "sanften" Gradienten allerdings nur unwesentlich verschoben.

Die Trennversuche mit der Free-Flow-Elektrophorese basierten auf der Hypothese, daß menschliche Spermatozoen in Abhängigkeit vom jeweiligen Geschlechtschromosom unterschiedliche Oberflächenladungen besitzen.

Mit zwei verschiedenen Apparaturen zur trägerfreien Ablenkungselektrophorese wurde das Verhalten der Spermatozoen im elektrischen Feld untersucht. Bei ca. 8 % der Versuche konnte eine Trennung nach X- und Y- Spermatozoen beobachtet werden, mit einer durchschnittlichen Anreicherung von 70 % für Gyno- und Androspermatozoen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von KANEKO et al. (1983/84) weisen hier die Y- Spermatozoen eine größere elektrophoretische Mobilität auf.

Neben einer erheblichen Schädigung der Spermatozoen durch das elektrische Feld, die sich besonders in einer starken Verminderung der Zellbeweglichkeit und in der Tendenz zu Aggregationen bemerkbar macht, erschwert die mangelnde Reproduzierbarkeit der Trennerfolge zur Zeit noch eine wissenschaftliche oder medizinische Nutzung dieses Verfahrens. Offensichtlich gibt es zahlreiche, bisher unbekannte Faktoren, die vor und während der Trennung die elektrophoretische Beweglichkeit der Samenzellen beeinflussen können.

Neben diesen beiden Trennverfahren wurde noch eine neuartige Methode zur Selektion motiler Spermatozoen erprobt und auf mögliche Beeinflussungen auf die Geschlechtsverteilung untersucht.

Eine von TEA et al. (1986) entwickelte Migrations-Sedimentations-Kammer erlaubt die Anreicherung motiler Spermatozoen im Überstand, mit anschließendem Sedimentieren in ein integriertes Auffanggefäß.

Die Gesamtmotilität der in Pilotexperimenten getesteten Ejakulate konnte um durchschnittlich 60 % (29 Prozentpunkte) gesteigert werden.

Eine selektive Anreicherung nach X- oder Y- Spermatozoen war bei keinem der Versuche nachweisbar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ARCIDIACONO A., H. WALT, A. CAMPANA, M. BALERNA (1983):
The use of Percoll gradients for the preparation of subpopulations of human spermatozoa
Int. J. of Andrology 6:433-445
- BACCETTI B., B.A. AFZELIUS (1976):
The Biology of the Sperm Cell
Monographs in Dev. Biol. Vol.10 pp.10-33
- BARLOW P., C.C. VOSA (1970):
The Y-Chromosome in Human Spermatozoa
Nature 226:961-962
- BERGER T., R.P. MARRS, D.L. MOYER (1985):
Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa
Fertil Steril 43:268-273
- BERGMAN A., M.P. DAVID, Z.T. HOMONNAI, G.F. PAZ (1982):
A method for improvement of sperm quality of an ejaculated human specimen using bovine mucus as a biological filter.
J. Androl. 31:199-204
- BROER K.-H., U. DAUBNER, R. KAISER, G.F.B. SCHUMACHER (1978):
The Failure to Separate Human X- and Y-Spermatozoa by the Millipore Filtration Technique
J. of Reprod. Medicine 20:67-69
- BROER K.-H., R. KAISER (1979):
Die Sexratio-Variationen und Steuerungschancen
Sonderdruck der Uni-Frauenklinik Köln
- BROER K.-H., R. KAISER, U. DAUBER (1977):
Versuche zur Trennung von X- und Y-Spermatozoen
Archiv für Gynäkologie 224:437-438
- BRUNNER MEDIZINTECHNIK (1986):
Mikroprozessor-Bildanalyse-System AT-CAS 188
Allgemeine Beschreibung (Bedienungsanleitung)
- CASPERSSON T., L. ZECH, C. JOHANSSON (1970):
Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes
Exptl. Cell Res. 60:315-319

- COLLE A., R. GUINET, M. LECLERCO, Y. MANUEL (1976):
Occurrence of β_2 -micro-globulin and post-gamma-globulin in human semen
Clin. Chim. Acta 67:93-97
- DANIELL J.F., C.M. HERBERT, J. REPP, C.A. TORBIT, A.C. WENTZ (1982):
Initial evaluation of a convection counter streaming galvanization technique of sex separation of human spermatozoa
Fertil Steril 38:233-236
- DOWNING D.C., D.L. BLACK (1976):
Equality in survival of X and Y chromosome-bearing human spermatozoa
Fertil Steril 27:1191-1193
- DOWNING D.C., D.L. BLACK, W.H. CAREY, D.L. DELAHANTY (1976):
The effect of ion-exchange column chromatography on separation of X and Y chromosome-bearing human spermatozoa
Fertil Steril 27:1187-1189
- DREVIUS, L.D. (1971):
The sperm rise test
J. Reprod.Fertil. 24:427-429
- ELIASON R., C. LINDHOLMER (1972):
Distribution and properties of spermatozoa in different fractions of split ejaculates
Fertil Steril 23:252-254
- ERICSSON R.J., C.N. LANGEVIN, M. NISHINO (1973):
Isolation of fractions rich in human Y sperm
Nature 246:421-424
- FAWCETT D.W. (1975):
The Mammalian Spermatozoon
Developmental Biology 44:394-436
- FRIBERG J. (1974):
Clinical and immunological studies on sperm-agglutination antibodies in serum and seminal fluid
Acta Obstet. Gynec. Scand. 53, Suppl. 36:1-19

- GARNER D.L. (1984):
 Semen Sexing; An Overview of Separation of X-
 and Y-Spermatozoa
 Proceed. of the 10th techn. Conf. on Artificial
 Insemination and Reprod., Columbia, Missouri,
 reprint pp. 1-5
- GLEDHILL B.L. (1983):
 Control of mammalian sex ratio by sexing sperm
 Fertil Steril 40:572-574
- GORUS F.K., D.G. PIPELEERS (1981):
 A Rapid Method for the Fractionation of Human
 Spermatozoa According to their Progressive
 Motility
 Fertil Steril 35:662-665
- HAFEZ E.S.E. (ed.) (1980):
 Human Reproduction
 Harper & Row, Publishers pp. 92-103
- HANNIG K., H.G. HEIDRICH (1978):
 Die Trägerfreie Ablenkungselektrophorese
 Schrift des Max-Planck-Instituts für Biochemie,
 8033 Martinsried
- HANNIG K., H. WIRTH, B.-H. MEYER, K. ZEILLER (1975):
 Free-Flow Elektrophoresis I
 Theoretical and Experimental Investigations of
 the Influence of Mechanical and Elektrokinetic
 Variables on the Efficiency of the Method
 Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 356:1209-1223
- HARTMANN R., R. STEINER, N. HOFMANN, R. KAUFMANN (1983):
 Human Sperm Motility - Enhancement and Inhibi-
 tion Measured by Laser Doppler Spectroscopy
 Andrologia 15:120-134
- HIRSCHMANN-MUNICH (1985):
 ACE Operators Manual
- HOLSTEIN A.F., E.C. ROOSEN-RUNGE (1981):
 Atlas of Human Spermatogenesis
 Grosse Verlag, Berlin pp. 217-219

HYNE R.V. (1979):

Calcium-dependent increase in adenosin 3',5'-
monophosphate and induction of the acrosome
reaktion in guinea pig spermatozoa
Proc.Natl.Acad.Sci USA Vol 76,No 11, 5699-5703

JANSEN M.T., C.W. LEEFLANG (1966):

Feulgen-DNA content of individual bull spermatozoa
Exptl. Cell Res. 44:614-616

JECHT E.W., J.J. RUSSO (1973):

A system for the quantitative analysis of human
sperm motility
Andrologia 5:215-221

JEDDI E., J.F. GUERIN, J.C. CZYBA (1977):

Have Human Spermatozoa a Thermopreferendum
Biol. of Reprod. 16:561-563

JEULIN C., C. SERRES, P. JOUANNET (1982):

The effects of centrifugation, various synthe-
tic media and temperature on the motility and
vitality of human spermatozoa
Reprod. Nutr. Develop. 22:81-91

JOUANNET P., B. VOLOCHINE, P. DEGUENT, C. SERRES,
G. DAVID (1976):

Light Scattering Determination of Various Cha-
racteristic Parameters of Spermatozoa Motility
in a Serie of Human Sperm
andrologia 9:36-48

JOSEPH A.M., J.R. GOSDEN, A.C. CHANDLEY (1984):

Estimation of aneuploidy levels in human
spermatozoa using chromosome specific probes
and in situ hybridation
Hum. Genet. 66:234-238

KAISER R., K.H. BROER, P. CITOLER, B. LEISTER (1974):

Nachweis Y-Chromatin-positiver Spermien im Zer-
vikalsekret beim In-vitro-Penetrationstest
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 34:426

KAISER R., P. CITOLER, K.H. BROER, K.P. HELLRIEGEL
Differenzierung von X- und Y-Spermien
Archiv für Gynäkologie 224:437-438

- KANEKO S., R. IIZUKA, H. MOHRI, S. OSHIO, S. OSHIRO,
H. NAKAJIMA (1983):
Separation of Human X- and Y- Bearing Sperm
using Free-Flow Elektrophoresis
Proc. Japan Acad. Vol.59, No.8, pp 276-279
- KANEKO S., R. IIZUKA, H. MOHRI, S. OSHIO, T. KOBAYASHI
(1984):
Human X- and Y- Bearing Sperm Differ in Cell
Surface Sialic Acid Content
Biochemical and Biophysical Research Communica-
tion 124:950-955
- KANEKO S., S. OSHIO, T. KOBAYASHI, H. MOHRI, R. IIZUKA
(1984):
Selective isolation of human X-bearing sperm by
differential velocity sedimentation in Percoll
density gradients
Biomedical Research 5:187-194
- KANEKO S., J. YAMAGUCHI, T. KOBAYASHI, R. IIZUKA
(1983):
Separation of human X- and Y-bearing sperm
using Percoll density gradient centrifugation
Fertil Steril 40:661-665
- KANEKO S., H. SATO, K. KOBANAWA, T. KOBAYASHI, R. IIZUKA
(1986):
Development Growth + Differentiation
New Horizons in Spermatozoa Research
Fifth International Symposium on Spermatology
August 25-29, 1986, Fujiyoshida, Japan
- KIERSZENBAUM A.L., L.L. TRES (1974):
J. Cell Biol. 60:39-42
- KORTING G.W. (1981):
Biochemie des Seminalplasmas (von W.-B. SCHILL)
Dermatologie in Praxis und Klinik, Band 4
Georg Thieme Verlag pp. 52:42-53
- KRAUSE W. (1984):
Die Möglichkeiten der Separation von Spermato-
zoen
Der Hautarzt 35:354-358

- KRAUSE W., C.F. ROTHAUGE (1981):
 Andrologie
 Stuttgart: Enke pp.18-31
- KRSTIC R.V. (1976):
 Ultrastruktur der Säugetierzellen
 Springer Verlag, Berlin - Heidelberg
- LINDHOLMER C. (1973):
 Survival of human spermatozoa in different
 fractions of split ejaculates
 Fertil Steril 24:521-523
- LUECK J., L.J.D. ZANEVELD (1977):
 Cytogenetics of spermatozoa: Y chromosome
 staining
 Techniques of Human Andrology 9:203-207
- LUDVIK W. (1976):
 Andrologie
 Thieme Verlag, Stuttgart pp. 10-12
- MAKLER A. (1978):
 A new multiple exposure photography method for
 objective human spermatozoal motility determi-
 nation
 Fertil Steril 30:192-199
- MAKLER A., O. MURILLO, G. HUSZAR, B. TARLATZIS,
 A. DECHERNEY, F. NAFTOLIN (1984):
 Improved techniques for separating motile
 spermatozoa from human semen.
 An atraumatic centrifugation method.
 Int.J.Androl. 7:71-78
- McKUSICK V.A. (1983):
 Mendelian inheritance in man
 Johns Hopkins University Press, Baltimore,
 London pp. xi-xvii
- MITCHELL J.A., L. NELSON, E.S.E. HAFEZ (1976):
 Motility of spermatozoa
 Human semen and fertility regulation in men,
 Saint Louis, Mosby Company pp. 83-99

- MORTIMER D., A.M. COURTOT, Y. GIOVANGRANDI, C. JEULIN,
G. DAVID (1984):
Human sperm motility after migration into and
incubation in synthetic media.
Gamete Res. 9:131
- MURKEN J., H. CLEVE (1984):
Humangenetik
Enke Verlag, pp. 86-88
- OLESKE J., C. TSAO, T. KUSHNICK (1971):
Use of a modified quinacrine fluorochrome in
the study of interphase cells for "Y-bodys"
Exptl. Cell Res. 69:442-444
- PAULSON J.D., K.L. POLAKOSKI, S. LETO (1979):
Further characterisation of glass wool column
filtration of human semen.
Fertil.Steril. 32:125-126
- PEARSON P.L., M. BOBROW, C.G. VOSA (1970):
Technique for Identifying Y Chromosomes in
Human Interphase Nuclei
Nature 226:78-80
- PEETERS H. (1976):
The use of density gradients of Percoll for the
separation of biological particles
In: Separation cells and subcellular elements
Pergamon press, Oxford/New York pp. 514-519
- PHARMACIA FINE CHEMICALS (1980):
Percoll[®], Methodology and applications
- PORSTMANN T., W. ROHDE, S. PREHN, B. PORSTMANN,
H. SCHMECHTA, S. ENGEL, G. DORNER (1978):
Partielle Trennung von menschlichen Gyno- und
Androspermien mittels Sephadexchromatographie,
Dichtegradientenzentrifugation in Saccharose
und Dextran sowie durch progressive Motilität
im Zervixsekret
Dermatol. Monatsschr. 164:550-556

- POUSETTE A., E. AKERLÖF, L. ROSENBERG, B. FREDRICSSON
(1986):
Increase in progressive motility and improved
morphology of human spermatozoa following their
migration through Percoll gradients
Int. J. of Andrology 9:1-13
- POUSETTE A., L. ROSENBERG, B. FREDRICSSON:
Tenfold Increase of Progressive Motility and
Improved Morphology by Separation of Human
Spermatozoa on Percoll
Poster of Obst and Gyn Chem, Huddinge Universi-
ty Hospital, Karolinska Institutet, Stockholm
- QUINLIVAN W.L.G., K. PRECIADO, T.L. LONG, H. SULLIVAN (1982)
Separation of human X- and Y- spermatozoa by
albumin gradients and sephadex chromatography
Fertil Steril 37:104-107
- QUINLIVAN W.L.G., H. SULLIVAN (1974):
The Ratios and Separation of X and Y Spermato-
zoa in Human Semen
Fertil Steril 25:315-317
- ROBERTS A.M. (1972):
Gravitational Separation of X and Y Spermatozoa
Nature 238:223-225
- ROBERTS A.M., H. GOODALL (1976):
Y chromosome visibility in quinacrine-stained
human spermatozoa
Nature 262:493-494
- RUDAK E., P.A. JAKOBS, R. YANAGIMACHI (1978):
Direct analysis of the chromosome constitution
of human spermatozoa
Nature 274:911-913
- SARKAR S., D.L. JOLLY, T. FRIEDMANN, O.W. JONES (1984):
Swimming behavior of X and Y human sperm
Differentiation 27:120-125
- SCHATZ H., (1979):
Karyotypierung menschlicher Chromosomen
Facharbeit in Biologie,
Bibliothek des Gymnasiums Bad Tölz

- SCHILL W.-B. (1985)
 aus: FRITSCH TRENWALDER SCHILL
 Venerologie und Andrologie
 Heidelberger Taschenbuch Nr. 241
 Springer Verlag, pp. 182-190
- SCHILLING E., K. HANNIG, G. PASCHER (1969):
 Über das elektrophoretische Verhalten von
 schweren und leichten Samenzellen
 Abschlußbericht DFG (schi 8/6): "Geschlechtsbe-
 einflussung bei Haustieren"
- SCHIRREN C. (1982):
 Praktische Andrologie
 Schering ISBN 3-8055-3474-4 pp.19-34
- SHASTRY P.R., C.H. UMASHASHI, S.R. SHANTA (1977):
 Use of Ficoll-sodium metrizoate density
 gradient to separate human X- and Y-bearing
 spermatozoa
 Nature 269:58
- SHETTLES L.B. (1961):
 Difference in Human Spermatozoa
 Fertil Steril 12:20-24
- SHETTLES L.B. (1970):
 Factors Influencing Sex Ratios
 Int. J. Gynaec. Obstet. 8:643-647
- SHIRAI M., S. MATSUDA, S. MITSUKAWA (1974):
 Elektrophoretic Separation of X- and Y- Chromo-
 some- Bearing Sperm in Human Semen
 Tohoku J. exp. Med. 113:273-281
- STEENO O., A. ADIMOELJA, J. STEENO (1975):
 Separation of the X- and Y-bearing human sper-
 matozoa with the sephadex gel-filtration method
 Andrologia 7:95-97
- STERN L., K.L. KLEENE, B. GOLD, N.B. HECHT (1983):
 The gen expression during mammalian spermatogenesis
 Exp. Cell Res. 143:247-255

- STOLLA R. (1969):
Der DNS-Gehalt der X- und Y-Spermien
Tierärztliche Wochenschrift 8/9:163-165
- STRYER L. (1985):
Biochemie, 3.Auflage
Vieweg-Verlag, Braunschweig pp. 650-654
- SUMNER A.T., I.A. ROBINSON, H.J. EVANS (1971):
Distinguishing between X-, Y- and YY-Fluores-
cence and DNA Content
Nature New Biol. 229:231-233
- TEA N.T., M. JONDET, R. SCHOLLER (1986):
A "Migration-Gravity-Sedimentation" Method for
Collecting Motile Spermatozoa from Human Semen
Fondation de Recherche en Hormonologie, Paris
- UNTERBERGER F. (1930):
Das Problem der willkürlichen Beeinflussung des
Geschlechts beim Menschen
Dtsch. Med. Wochenschr. 56:304-307
- WAGNER T.E., J.S. YUN (1981):
Human sperm chromatin has a nucleosomal
structure
Arch. Androl. 7:251-257
- YANAGIMACHI R. (1978):
Calcium Requirement for Sperm-Egg Fusion in
Mammals
Biol. of Reprod. 19:949-958
- ZEILLER K., R. LÖSER, G. PASCHER, K. HANNIG (1975):
Free-Flow Elektrophoresis II
Analysis of the Method with Respect to Prepara-
tive Cell Separation
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 336:1225-1244

Die vorliegende Arbeit wurde an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München von Oktober 1984 bis März 1987 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. med. W.-B. Schill danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung, die mir die Durchführung dieser Untersuchungen ermöglichte.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. phil. nat F. Krassnigg, der mir mit Ratschlägen und Diskussionen bei der Durchführung der experimentellen Arbeit zur Seite stand.

Für die Überlassung des Untersuchungsmaterials und für die bereitwillige Unterstützung meiner Arbeit danke ich den Mitarbeitern des andrologischen Labors Frau M. Feifel, Frau A. Kaiser und Frau I. Koukowitzos, sowie allen übrigen Mitarbeitern der andrologischen Arbeitsgruppe.

Am 22. April 1960 wurde ich, Harald Schatz, als Sohn des Dipl. Ing. Ludwig Schatz und der Buchhalterin Gerda Schatz, geb. Lauterbach, in München geboren.

Von 1966 bis 1970 besuchte ich die Grundschule in München, anschließend bis 1979 das Gymnasium in Bad Tölz, wo ich im Sommer 1979 mit dem Abitur abschloß.

Mein Medizinstudium begann ich im Herbst 1979 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Im Sommersemester 1981 bestand ich die ärztliche Vorprüfung, im SS 1982 das erste und im SS 1984 das zweite Staatsexamen. Vom April 1985 bis März 1986 absolvierte ich das Praktische Jahr und im April 1986 legte ich das dritte medizinische Staatsexamen ab.

